FUNKTION DER PHOSPHOLIPIDE VON *Escherichia coli*

Untersuchungen mit Mutanten der Lipidsynthese

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Gerd Pluschke
aus Bad Wildungen

1979

FUNKTION DER PHOSPHOLIPIDE VON *Escherichia coli*

Untersuchungen mit Mutanten der Lipidsynthese

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Gerd Pluschke
aus Bad Wildungen

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juli 1979

Dekan: Prof. Dr. M. Hanack

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. P. Overath
Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. D. Mecke

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof.P.Overath am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen angefertigt.
Die DMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit Prof.J.Seelig und Dr.H.U.Gally (Biozentrum Basel) durchgeführt. Röntgenbeugungsmessungen habe ich am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen ausgeführt.Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen entstanden in Zusammenarbeit mit Dr.H.Schwarz. Herrn Prof. W.Stoffel (Inst.f.physiol.Chemie, Köln) habe ich für die Anfertigung von Massenspektren zu danken.

Herrn Prof.P.Overath danke ich für Themenstellung,hilfreiche Diskussionen und verständnisvolle Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.
Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, im Besonderen bei Frau Ing. G.Aichele und Herrn Dr. H.U.Schairer möchte ich mich für stete Hilfsbereitschaft bedanken.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente sind zum Teil im Journal of Biological Chemistry (1978) 253,5048 veröffentlicht worden.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. Modellsysteme für die Untersuchung der Membraneigenschaften	2
1.2. Aufbau der Zellhülle von E.coli	3
1.3. Mutanten der Lipidsynthese	6
1.4. Problemstellung	8
2. MATERIAL UND METHODEN	
2.1. Abkürzungen	9
2.2. Chemikalien	10
2.3. Geräte	11
2.4. Bakterien- und Phagenstämme	12
2.5. Medien, Puffer und Szintillatoren	15
2.6. Mikrobiologische Methoden	
2.6.1. Bestimmung des Zellwachstums	18
2.6.2. Aufbewahrung der Bakterienstämme	18
2.6.3. Transduktion	18
2.6.4. Konjugation	19
2.6.5. Routinemäßige Überprüfung des cls-Genotyps	20
2.6.6. Isolierung Tryptophan-auxotropher Mutanten	20
2.6.7. Isolierung von Rifampicin-resistenten Mutanten	21
2.6.8. Isolierung von Thymin-bedürftigen Mutanten	21
2.7. Isolierung von Membranen und Analyse der Membranproteine	
2.7.1. Gewinnung roher Membranfraktionen	21
2.7.2. Trennung von cytoplasmatischer und äußerer Membran	22
2.7.3. Proteinbestimmung	23
2.7.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	23
2.7.5. Bestimmung der Aktivität der NADH-Oxidase	24
2.8. Isolierung und Analyse der Membranlipide	25
2.8.1. Extraktion der Lipide	25
2.8.2. Säulenchromatographische Trennung	25
2.8.3. Dünnschichtchromatographische Trennung	26
2.8.4. Deacylierung der Phospholipide	27

2.8.5. Nachweis und Quantifizierung radioaktiv markierter Lipide 28
2.8.6. Phosphatbestimmung 29
2.8.7. Identifizierung der Phosphatide 29
2.8.8. Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung 30
2.8.9. Katalytische Hydrierung 31
2.8.10. Untersuchung von Lipidphasenumwandlungen 31
2.8.11. Röntgenbeugung 33
2.8.12. Deuteriummagnetische Resonanzspektroskopie 34

3. ERGEBNISSE
3.1. Eigenschaften einer Mutante mit Defekt in der Cardiolipinsynthese 36
3.1.1. Kartierung des cls-Gens 36
3.1.1.1. Unabhängigkeit der Mutation von dem temperatursensitiven Phänotyp des Stammes HI310 36
3.1.1.2. Hfr-Kreuzungen 37
3.1.1.3. F'-Kreuzungen; Rezessivität 39
3.1.1.4. Übertragung des cls⁻-Allels 39
3.1.1.5. Das cls-Gen liegt zwischen attØ80 und tyrT 40
3.1.1.6. Natur der cls-Mutation 42
3.1.2. Charakterisierung der Mutanten 44
3.1.2.1. Wachstum,Lipidzusammensetzung und Aktivität der Cardiolipinsynthase 44
3.1.2.2. Umsatz der anionischen Phospholipide 47
3.1.2.3. Einbau des Hüllproteins des Phagen M13 in die E.coli-Membran 50
3.2. Phasenumwandlungen der Membranlipide 55
3.2.1. Kombination der cls-Mutation mit Defekten in Fettsäuresynthese und -abbau 57
3.2.2. Phasenverhalten der isolierten Membranlipidkomponenten 59
3.2.3. Temperaturabhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit 66
3.2.4. Fettsäurehunger-Experimente 70
3.2.5. E.coli-Zellen,deren Lipide ausschließlich gesättigte Fettsäuren enthalten 79

3.3. Untersuchung der Konformation der Phospholipide in den Membranen von E.coli 83
3.4. Membranfusion 92
3.4.1. Kombination der psd-Mutation mit Defekten in Fettsäuresynthese und -abbau 94
3.4.2. Charakterisierung der Stämme T81GP und T82GP 95
3.4.3. Hybridisierung von Lipidvesikeln 97
3.4.4. Fusion von E.coli-Membranvesikeln 100

4. DISKUSSION 103
5. ABSTRACT 111
6. LITERATURVERZEICHNIS 112

1. Einleitung

Biologische Membranen sind selektive Permeabilitätsbarrieren, die für die Aufrechterhaltung der Integrität der lebenden Zellen sorgen und eine Kompartimentierung biochemischer Reaktionen ermöglichen. An zahlreichen wichtigen Lebensprozessen wie oxidativer Phosphorylierung, Photosynthese, Nervenleitung und hormoneller Regulation sind Membranen beteiligt. Voraussetzung für das Verständnis dieser Funktionen auf molekularer Ebene ist eine genaue Kenntnis der Membranstruktur.
Die heute allgemein akzeptierte Strukturvorstellung einer biologischen Membran (siehe Abb. 1) ist die einer fluiden Lipiddoppelschicht mit eingebetteten und angelagerten, peripheren Proteinen (fluide Mosaikmembran nach Singer und Nicholson (133)).

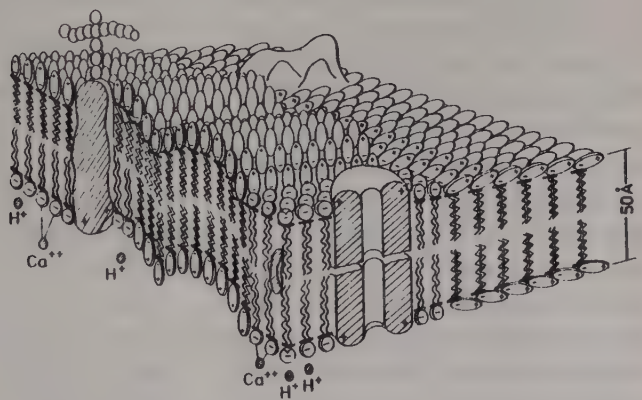


Abb.1: Modell einer biologischen Membran (übernommen von H. Träuble)

Bei Strukturuntersuchungen an biologischen und künstlichen Membransystemen sind neben chemischen auch zahlreiche physikalische Techniken eingesetzt worden (3). Die wichtigsten dieser Techniken sind Streuungsmethoden (Röntgen-, Raman- und Neutronenstreuung, Fluoreszenzmessung), magnetische Resonanzspektroskopie,Calorimetrie und Elektronenmikroskopie. Für sich geben alle diese Untersuchungstechniken nur indirekte und unvollständige Informationen. Erst durch ihre Kombination wird es möglich, ein detailliertes und selbst-konsistentes Bild der Membranstruktur zu entwickeln. Trotz intensiver Untersuchungen sind die molekularen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Bestandteilen biologischer Membranen und die Wechselbeziehungen zwischen Struktur und Funktion in vieler Hinsicht erst unzureichend charakterisiert.

1.1. Modellsysteme für die Untersuchung der Membraneigenschaften

Die am weitesten verbreiteten Membranlipide sind die Glycerophosphatide, die sich aus einem polaren und einem apolaren Molekülteil zusammensetzen (siehe Abb. 2). Beim Dispergieren in Wasser bilden sie spontan molekulare Doppelschichten aus. Dabei lagern sich die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten der lipidgebundenen Fettsäuren aneinander und grenzen sich durch die negativ geladenen oder zwitterionischen Kopfgruppen gegen das umgebende Wasser ab.
Unsere Vorstellungen von der Struktur und Dynamik der Lipide in biologischen Membranen wurden in den letzten Jahren besonders durch die Untersuchung derartiger künstlicher Lipid-Doppelschichtsysteme erweitert (multilamellare und unilamellare Liposomen (Vesikel),"black lipid"-Filme). Viele Untersuchungen weisen darauf hin, daß auch große Bereiche biologischer Membranen aus einer Lipiddoppelschicht bestehen (74).

Die molekulare Struktur von einigen Phospholipiden in reinen Lipiddoppelschichten ist heute bis ins Detail aufgeklärt (3, 16, 59, 122, 123, 155). Dagegen ist erst relativ wenig über die dynamische Konformation von Lipidmolekülen in biologischen Membranen bekannt, in denen Lipid-Protein-Wechsel-

wirkungen eine entscheidende Rolle spielen (26). Besonders geeignet für die Untersuchung dieser Wechselwirkungen sind rekonstituierte Modellsysteme aus isolierten Membranproteinen und definierten Lipidkomponenten. Erst in den letzten Jahren sind mit der Entwicklung leistungsfähiger Methoden zur Isolierung integraler Membranproteine in lipidfreier Form die Voraussetzungen für solche Untersuchungen geschaffen worden. Bei Rekonstitutionsexperimenten kann man einerseits untersuchen, wie sich die biologische Aktivität und Konformation der Proteine in Abhängigkeit von ihrer Lipidumgebung verändert. Andererseits liefert der Vergleich mit proteinfreien Lipiddispersionen auch Daten über den Einfluß der Proteine auf die physikalischen Eigenschaften der Lipide.

Beim Übergang von diesen rekonstituierten Modellsystemen zur Untersuchung intakter biologischer Membranen wird man im allgemeinen mit einer weitaus komplexeren Proteinzusammensetzung konfrontiert. So konnten zum Beispiel in den Membranen von E.coli durch zweidimensionale Elektrophorese mehr als 150 verschiedene Proteine nachgewiesen werden (118). Zum Studium der Anordnung und Funktion von Phospholipiden ist es daher von Vorteil, eine biologische Membran zu wählen, die nicht auch in der Lipidzusammensetzung wesentlich komplexer ist als ein rekonstituiertes Modellsystem. Dies spricht für die Untersuchung bakterieller Membranen, in denen viele Lipidkomponenten höherer Organismen (Steroide, Sphingolipide und Glykolipide) fehlen können. Extensive Erfahrung mit Genetik und Physiologie und eine vergleichbar gute Kenntnis vieler Membranprozesse machen E.coli zu einem besonders gut geeigneten Untersuchungsobjekt.

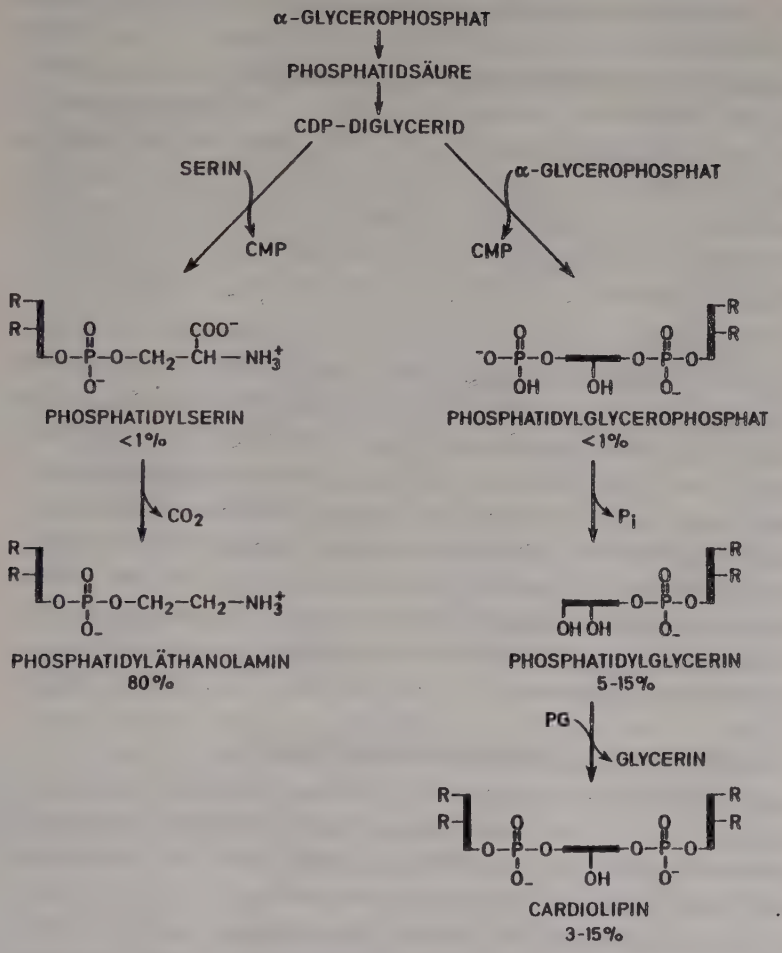
1.2. Aufbau der Zellhülle von E.coli

Die Zellhülle von E.coli setzt sich aus zwei Membranen zusammen, der cytoplasmatischen und der äußeren Membran, die durch eine Peptidoglykanschicht und den periplasmatischen Raum (Sitz einer Reihe von löslichen Proteinen) voneinander getrennt sind.

Die primäre Permeabilitätsbarriere der Zelle ist die cytoplasmatische Membran. In ihr sind neben spezifischen Transportproteinen die Enzymsysteme der oxidativen Phosphorylierung und verschiedener biosynthetischer Reaktionswege lokalisiert (116). Die Proteinzusammensetzung der Cytoplasmamembran ist komplex (118), der Lipidgehalt (ca. 0,8 mg/ mg Protein) weit höher als bei der äußeren Membren (ca. 0,3 mg /mg Protein) (95, 96).
Die äußere Membran enthält neben Protein und Lipid noch als dritte Hauptkomponente das Lipopolysaccharid, das ausschließlich in der zum umgebenden Medium gerichteten Seite der Membran lokalisiert ist (88) und etwa 40 % der Zelloberfläche bedeckt (12). Die Proteinzusammensetzung der äußeren Membran ist relativ einfach (43). Es dominieren einige wenige Hauptproteinkomponenten, die zum Teil als hydrophile Poren wirken. Die äußere Membran stellt eine Permeabilitätsbarriere für Substanzen mit einem Molekulargewicht von mehr als 700 dar.

Die Lipide von E.coli bestehen zu mehr als 90 % aus Glycerophosphatiden. Diese sind ausschließlich in den beiden Membranen lokalisiert und unterscheiden sich untereinander durch Größe, Form und Ladung ihrer polaren Kopfgruppen. Darüber hinaus liegen von jedem Lipid mehrere molekulare Spezies mit unterschiedlicher Fettsäurezusammensetzung vor. Die beiden Membranen von E.coli weisen nur geringe Unterschiede in ihrer Lipidzusammensetzung auf (76). Abb. 2 zeigt die Struktur und Biosynthese der wichtigsten Phosphatide (22, 109). Hauptlipidkomponente ist das zwitterionische Phosphatidyläthanolamin (PE) mit einem Anteil von ca. 80 %. Daneben findet man etwa 20 % anionische Lipide - hauptsächlich Cardiolipin (CL) und Phosphatidylglycerin (PG). Exponentiell wachsende Zellen enthalten etwa 15 % PG und 5 % CL. In der Stationärphase kehrt sich dieses Verhältnis um. Neben diesen drei Hauptkomponenten liegen nur noch Spuren anderer Phosphatide vor.
sn-Glycerin-3-phosphat ist Ausgangsprodukt für die Synthese

Abb. 2: Die Reaktionen der Phospholipidsynthese in E.coli



aller Phospholipide von E.coli. Durch Anlagerung von zwei Acylgruppen entsteht daraus Phosphatidsäure, die anschließend in einem CTP-abhängigen Schritt aktiviert wird. Das dabei entstehende CDP-Diglycerid hat eine zentrale Funktion bei der Phospholipid-Biosynthese. Es ist sowohl Vorstufe des zwitterionischen PE als auch des anionischen PG. Der Phosphatidylrest des energiereichen Liponukleotids wird durch die PS-Synthase auf Serin und durch die PGP-Synthase auf Glycerinphosphat übertragen. PS und PGP liegen in den Membranen nur in Spuren vor, da beide Lipide rasch in PE (PS-Decarboxylase) bzw. PG (PGP-Phosphatase) umgewandelt werden. Die Biosynthese von Cardiolipin erfolgt durch eine Transphosphatidylierungsreaktion aus zwei Molekülen PG (58, 65).

Die lipidgebundenen Fettsäuren gehören zu etwa gleichen Teilen zum gesättigten (12:0, 14:0, 16:0, 18:0) und zum einfach cis-ungesättigten Typ (cis-Δ^9-16:1 und cis-Δ^{11}-18:1). Besonders in der Stationärphase werden die cis-Monoensäuren durch Methylierung teilweise in Cyclopropanderivate umgewandelt (17). Die Enzyme der Fettsäure- und Glycerinphosphat-Synthese liegen frei im Cytoplasma gelöst vor. Der größte Teil der Aktivität der PS-Synthase ist in Zellysaten mit der ribosomalen Fraktion assoziiert. Alle weiteren Enzyme der Phospholipidsynthese sind dagegen fest an die cytoplasmatische Membran gebunden (109).

1.3. Mutanten der Lipidsynthese von E.coli

Untersuchungen mit Mutanten der Phospholipidsynthese von E.coli haben in den vergangenen Jahren wichtige Erkenntnisse über die Funktionen der Membranlipide geliefert. Drei Klassen von Mutanten können unterschieden werden.

A. Mutanten mit Defekt in der Fettsäuresynthese (19, 21, 130)
Mutanten mit absoluten oder temperatursensitiven Defekten in Enzymen der Synthese von ungesättigten Fettsäuren (fabA (132), fabB (115), Cyclopropanfettsäuren (137) oder der gesamten Fettsäuresynthese (fabD (51), fabE (7)) stehen zum Teil bereits seit über 10 Jahren zur Verfügung. Durch Supplementie-

rung kann man bei diesen Mutanten die Fettsäurezusammensetzung der Membranlipide in weiten Grenzen manipulieren. Extensive Untersuchungen zeigten, daß dabei die physikalischen Eigenschaften der Kohlenwasserstoffketten von größerer Bedeutung sind als ihre spezifische chemische Struktur (21, 98).

B. Mutanten mit Defekt in frühen Schritten der Phospholipidsynthese

Von Bell (8) sind Stämme mit Defekt in Synthese (gpsA) und Acylierung (plsB) von Glycerin-3-phosphat isoliert worden. Untersuchungen mit diesen Mutanten haben wichtige Aufschlüsse über die Regulationsmechanismen geliefert, durch die Phospholipid- und Makromolekülsynthese aufeinander abgestimmt werden. Unter nicht-permissiven Bedingungen kommt es zur Einstellung der gesamten Lipidsynthese, aber zu keiner Verschiebung der Lipidzusammensetzung (109).

C. Mutanten mit Defekt in späten Schritten der Phospholipidsynthese

Bei Stämmen mit Defekten in späten Reaktionsschritten der Phospholipidsynthese (nach Synthese des CDP-Diglycerids; siehe Abb. 2) kann man das relative Verhältnis der polaren Kopfgruppen der Lipide in der Membran verschieben. Die Isolierung von solchen Mutanten ist aufwendig, da hier eine Supplementierung nicht möglich ist. Exogene Phospholipide werden zum größten Teil abgebaut und können nur in geringen Mengen in die Membranen integriert werden (22, 70a). Dies erklärt, warum erst seit relativ kurzer Zeit einige solcher Mutanten zur Verfügung stehen.
Bisher beschrieben worden sind Stämme mit temperatursensitiven Enzymen der PE-Synthese (PS-Synthase (pss) und PS-Decarboxylase (psd)), die bei restriktiver Temperatur anionische Lipide akkumulieren und in der Folge das Zellwachstum einstellen (55,92,108).

Mit den zur Verfügung stehenden Mutanten der Lipidsynthese stellt E.coli das zur Zeit beste System für die Untersuchung der Auswirkungen dar, die sich aus Veränderungen der Lipid-

zusammensetzung für die strukturellen und funktionellen Eigenschaften einer biologischen Membran ergeben. Im Rahmen solcher Untersuchungen werden in der vorliegenden Doktorarbeit Eigenschaften einer weiteren Mutante mit Defekt in einem späten Schritt der Phospholipidsynthese beschrieben.

1.4. Problemstellung

Ausgangspunkt für die Durchführung dieser Arbeit war die in meiner Diplomarbeit (105) beschriebene Isolierung einer Mutante mit Defekt in der Cardiolipinsynthese.
Eine Übertragung des defekten Allels in Stämme mit definiertem Genotyp war Voraussetzung für die phänotypische Charakterisierung der Mutation. Hierfür mußte mit der Kartierung des defekten Gens (cls = cardiolipinsynthesis) auf dem E.coli-Chromosom zunächst die Voraussetzung geschaffen werden. Eine Untersuchung über den Einfluß der cls-Mutation auf den Umsatz der anionischen Phospholipide sollte in der Folge Aufschlüsse über die biologische Funktion des Cardiolipins liefern.
Im Verlauf der Arbeit zeigte sich, daß sich die von der Mutation hervorgerufenen Veränderungen der Kopfgruppenzusammensetzung auf die Phasenumwandlungstemperatur der Membranlipide auswirken. Hieraus ergaben sich weitere Experimente, die sich mit der Funktion der lipidgebundenen Fettsäuren befaßten.
Ein weiteres Ziel dieser Doktorarbeit war es, Aufschlüsse über die Natur, Spezifität und biologische Bedeutung von Lipid-Protein-Wechselwirkungen zu erhalten. Zum einen war es durch die Isolierung der cls-Mutation möglich geworden, zu überprüfen, ob spezifische Wechselwirkungen mit Cardiolipin für die Inkorporation des Hüllproteins des Phagen M13 in die E.coli-Membran essentiell sind. Im weiteren wurden Deuterium-kernresonanzspektroskopische Untersuchungen an Zellen, isolierten Membranen und Liposomen durchgeführt, um Informationen über den Einfluß von Membranproteinen auf die Struktur der Lipide zu erhalten. Abschließend wurde im Hinblick auf Komplementationsstudien versucht, eine Methode für die Fusion von E.coli-Membranvesikeln zu entwickeln.

2. Material und Methoden

2.1. Abkürzungen

2.1.1. Genetische Symbole (6)

arg, cys, hemA, his, ilv, leu, met, pro, pur, pyr, thi, thr, thyA, trp: Auxotropie für Arginin, Cystein, δ-Aminolävulinsäure, Histidin, Isoleucin und Valin, Leucin, Methionin, Prolin, Adenin (Purine), Uracil (Pyrimidine), Thiamin, Threonin, Thymin, Tryptophan

fad, gal, lac, mal, mel, mtl, rha, xyl: Unfähigkeit zum Abbau von Fettsäuren, Galaktose, Laktose, Maltose, Melibiose, Mannitol, Rhamnose, Xylose

ton, rpoB, strM: Resistenz gegen T1-Phagen, Rifampicin, Streptomycin

cls, dgk, fabB, gps, pgs, pldA, plsB, psd, pss, rec, tdk: Defekt in der Cardiolipinsynthese, Diglyceridkinase, 8-Ketoacyl-ACP-Synthetase I, Glycerinphosphat-Dehydrogenase, PGP-Synthase, Phospholipase A, Acyltransferase, PS-Decarboxylase, PS-Synthase, genetischen Rekombination, Desoxythymidin-Kinase

tyrT: Tyrosin-tRNA 1
sup: Suppressor
mut: Mutator
rel: relaxed
attØ80: Integrationsstelle für den Phagen Ø80

2.1.2. Sonstige Abkürzungen

ACP	Acylcarrierprotein
ATP	Adenosintriphosphat
Brij35	Polyoxyäthylendodecyläther
CL	Cardiolipin
CoA	Coenzym A
cpm	Zählimpulse pro Minute
CTP	Cytidintriphosphat
DMR	Deuteriummagnetische Resonanz
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	Zerfälle pro Minute

EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
ESR	Elektronenspinresonanz
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NMR	Kernmagnetische Resonanz
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidyläthanolamin
Pipes	Piperazin-1,4-diäthansulfonsäure
PhNap	N-Phenyl-1-naphthylamin
PG	Phosphatidylglycerin
PGP	Phosphatidylglycerinphosphat
PI	Phosphatidylinositol
PS	Phosphatidylserin
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tricin	N-Tris-(Hydroxymethyl)-Methylglycin
Tris	N-Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan

2.2. Chemikalien

Soweit im folgenden nicht anders vermerkt, wurden sämtliche Chemikalien von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

Bayer, Leverkusen
Ampicillin (Binotal^{R})

Boehringer, Mannheim
NADH

Difco Laboratories, Detroit
Casamino acids, Agar, Hefeextrakt, Trypton

New England Nuclear
L-^{14}C(U)-Lysin(282 mCi/mMol), Omnifluor, trägerfreies ^{32}Phosphat, Protosol

Roth, Karlsruhe
Elaidinsäure, Ölsäure

Serva, Heidelberg
Acrylamid, Apiezon L auf Gaschrom P, Brij 35, Coomassie Brilliant Blue R250, DEGS auf Gaschrom P, Dowex 50, Lysozym aus

Eiweiß (22000 Einheiten/mg), Methylenbisacrylamid, SDS, Streptomycinsulfat, TMED, Tricin, Triton-X-100

Sigma, St. Louis
MOPS, Palmitelaidinsäure, Rifampicin, Trimethoprim

Whatman
Carboxymethylcellulose CM 52

PhNap: P. Overath
deuterierte Fettsäuren: J. Seelig

2.3. Geräte

Flüssigkeits-Szintillationszähler Packard Tri-Carb 2425
Micro-Sample Spectrophotometer Gilford 300N
Spectrophotometer Gilford 240
Spectrofluorimeter Hitachi-Perkin-Elmer MPF3 mit Hewlett-Packard XY-Schreiber 7001AM
Joyce-Loebl Microdensitometer 3CS
Röntgenröhre AEG F50,21
Guinierkamera Huber, Rimstig
Gaschromatograph: Packard Flow-Controller 824
Column Air Oven 804
Temp.-Setpoint Programmer 846
Deviation Temp.-Controller 873
Dual Electrometer 843
Dual H.V.-Supply 834
Siemens Kompensograph III
Tischzentrifuge Christ UJI
Beschallstab Bronson Sonifier B12
Beschallbad Bandelin Sonorex RK 510

2.4. Bakterien- und Phagenstämme

Bakterienstämme	Relevanter Genotyp	Herkunft
T1GP	F^-,cls,ilv,met	Diplomarbeit
T2GP	F^-,fabB,fadE,cls / Transduktante des Stammes T51GP (Donor:T1GP)	diese Arbeit
T11GP	F^-,cls,temperaturresistente Transduktante des Stammes HI310 (Donor: K12Ymel)	"
T12GP	F^-,cls / Transduktante des Stammes T11GP (Donor: K12Ymel),gleiche Wuchsstoff-Bedürfnisse wie PA3092	"
T13GP	F^-,cls / P1-sensitive Rekombinante des Stammes T12GP	"
T14GP	F^-,cls,trp^+ / Tryptophan-prototrophe Transduktante des Stammes T13GP (Donor:K12Ymel)	"
T15GP (Hfr10GP)	Hfr,thi,relA	Diplomarbeit
T16GP (Hfr1GP)	Hfr,cls,thi,relA	"
T17GP	F^-,cls,trp,thyA,thi / Histidin-prototrophe Transduktante des Stammes T13GP (Donor K12Ymel)	diese Arbeit
T20GP	F^-,fabB,fadE /Transduktante des Stammes T51GP (Donor:T1GP)	"
T51GP	F^-,fabB,fadE,trp / Mutagenese-Derivat des Stammes K1062	"
T81GP	F^-,fabB,fadE,cls,psd,rpoB / Transduktante des Stammes T96GP (Donor: T1GP)	"
T82GP	F^-,fabB,fadE,psd,rpoB / Transduktante des Stammes T96GP (Donor:T1GP)	"
T86GP	F^-,psd,thyA / Thymin-auxotrophes Derivat des Stammes EH150	"
T91GP	F^-,psd,thyA,rpoB / Rifampicin-resistentes Derivat des Stammes T86GP	"

T93GP	Hfr,psd,rpoB / Derivat einer Kreuzung von Stamm T91GP mit KL14	diese Arbeit
T94GP	Hfr,psd,thyA,rpoB / Thymin-auxotrophes Derivat des Stammes T93GP	"
T96GP	F^-,fabB,fadE,psd,trp,rpoB / Derivat einer Kreuzung des Stammes T51GP mit T94GP	"
T111GP	F^-,fabB,fadE,cls / ohne Fettsäure-Supplement wachsendes Derivat des Stammes T2GP	"
T114GP	F^-,fabB,fadE,cls / reisoliert aus T111GP	"
A201	F^-,trp,pro,metE,his,hemA,rha,lacI	H.U.Schairer
EH150	F^-,psd	E.P.Kennedy
Hfr3000YA149	Hfr,pyrF,thi,relA	H.U.Schairer
Hfr6	Hfr,metB,mut,mal,mtl,rel	"
HfrH	Hfr,thi,rel	"
HI310	F^-,cls / temperatur-sensitives Mutagenesederivat des Stammes PA3092	Y.Hirota
K12Ymel	F^- / E.coli-Wildtyp	P.Overath
K37(Su_I^+)-S26Rle	F^+,sup^-	R.Konings
K38(Su_I^-)-S26	F^+,sup^+	"
K1062	fabB,fadE	P.Overath
KL14	Hfr,thi,rel	H.U.Schairer
KL208	Hfr,rel	"
KL226	Hfr,rel	"
KLF23	F'123,chromosomale Marken:thi,pyrD,his,trp,recA,mtl,xyl,malA,galK,strM	"
KLF25	F'125,chromosomale Marken wie KLF23	"

MCI72Δ(galU-attØ80)-31	pro,pur,trp,thi,Deletion,die sich ausgehend von attØ80 über galU und tdk erstreckt	A.Markovitz
MCI76Δ(galU-attØ80)-45	wie MCI172-31	"
MCI76/λattØ80	pro,pur,trp,thi	"
PA3092	F⁻,thr,leu,trp,his,thyA,argH,thi,lacY,melA,mtl,xyl,tonA,supE, strM	Y.Hirota
W3110Δ(tonB,trp)AE1	Deletion,die ausgehend von attØ80 zwischen cysB und trp endet	C.Yanofsky

Bakteriophagen

P1kc	H.U.Schairer
M13-amber5-H3	R.Konings

2.5. Medien,Puffer und Szintillatoren

2.5.1. Nährlösungen

Medium 1

in 1l Wasser: 10g Trypton,5g Hefeextrakt,10g NaCl

Medium 2

in 1l Wasser:20ml VB-Konzentrat,1ml VB-Spurenelemente
Die jeweils benötigten Wuchsstoffe,Antibiotika und die Kohlenstoffquelle (i.A. 0,2 % Glucose) werden nach dem Autoklavieren zugegeben.
VB-Konzentrat:folgende Substanzen werden nacheinander in 670ml Wasser gelöst: 10g $MgSO_4$ x 7 H_2O,100g Citronensäure x H_2O,500g K_2HPO_4, 175g $NaNH_4HPO_4$x 4 H_2O
VB-Spurenelemente: in 1l Wasser:230mg $CoSO_4$ x 7 H_2O, 290mg H_3BO_3, 750mg $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ x 4 H_2O, 800mg $FeCl_3$ x 6 H_2O, 380mg $MnSO_4$ x H_2O 500 mg $CuSO_4$ x $5H_2O$, 4200mg $ZnSO_4$ x 7 H_2O
Wuchsstoffe: L-Aminosäuren 50/ug/ml
Thiamin 10/ug/ml
Thymin 100/ug/ml
Antibiotika:Streptomycin,Rifampicin je 100/ug/ml

Medium 3 (154)

0,1M TrisHCl, 0,0085M NaCl, 0,1M KCl, 0,02M NH_4Cl, 0,34mM KH_2PO_4, 0,16mM Na_2SO_4, 2,5mM $CaCl_2$, 2,5mM $MgCl_2$(pH 7,3) Nach dem Autoklavieren werden folgende Supplemente zugegeben:0,2 % Glucose, 10 /ug/ml Thiamin und 50/ug/ml von allen Aminosäuren außer Lysin.

Medium 4 (45)

0,1M TrisHCL, 80mM NaCl, 20mM KCl, 20mM NH_4Cl, 3mM Na_2SO_4, 1mM $MgCl_2$, 0,2mM $CaCl_2$, 2/uM $FeCl_3$, 0,5mM KH_2PO_4 (pH 7,5) 0,2 % Glucose, 10 /ug/ml Thiamin

Medium 5 (LT)

in 1l Wasser: 10g Trypton, 5g NaCl, 1ml 1M $MgSO_4$
wenn angegeben mit Ölsäuresupplement: 0,5 % Brij 35, 0,01 % Ölsäure

Medium 6 (89)

100 ml MOPS-Konzentrat, 10ml K_2HPO_4 (0,132 M), 5ml Glycerin (80 %), 100 ml Aminosäurekonzentrat, 785 ml Wasser

MOPS-Konzentrat: 400ml MOPSKOH (1M) pH 7,4 , 40ml TricinKOH (1M) pH 7,4, 10 ml $FeSO_4$ (10mM), 50ml NH_4Cl (1,9M), 10ml K_2SO_4 (0,3M), 10ml $CaCl_2$ (0,5mM) 10ml $MgCl_2$ (0,5M), 100 ml NaCl (5M), 10ml $(NH_4)_6(MoO_7)_{24}$ (3/uM), H_3BO_3 (0,4mM), $CoCl_2$ (30/uM), $CuSO_4$ (10/uM), $MnCl_2$ (80/uM), $ZnSO_4$ (10/uM), 360ml Wasser
Das Konzentrat wird filtersterilisiert und bei -20°C aufbewahrt.
Aminosäurekonzentrat: L-Serin 100mM, L-Arginin 50mM, L-Cystein 1mM, alle übrigen L-Aminosäuren 10mM

Medium 7

925ml Wasser, 20ml VB-Konzentrat, 1ml VB-Spurenelemente (siehe Medium 2)
Nach dem Autoklavieren werden 50ml Casamino acids (6 %) und 6,5ml Glycerin(80 %) zugegeben.
Wenn angegeben mit Fettsäuresupplement: 0,5 % Brij 35, 0,01 % Fettsäure

2.5.2. Nährböden

Zur Verfestigung wird den Flüssigmedien 15g Agar/l beigegeben. Dieser wird i.A. getrennt von den Salzlösungen autoklaviert.

P1-Platten

in 1l Wasser: 10g Trypton, 5g Hefeextrakt, 7,5g NaCl, 10g Agar

Nach dem Autoklavieren werden 5 ml Glucose (20 %) und 25 ml $CaCl_2$ (0,1M) zugefügt.

P1-Weichagar

Rezept wie für P1-Platten , aber nur 6g Agar/l

2.5.3. Puffer

Puffer 1

20 ml VB-Konzentrat, 980 ml Wasser (siehe Medium 2)

Puffer 2

100 mM NaCl, 10 mM MOPS x NaOH, 0,1 mM EDTA (pH 7,3)

2.5.4. Szintillatoren

Tritosol-Szintillator (48, 100)

4 g Omnifluor, 250 ml Triton X-100, 35 ml Äthylenglycol, 140 ml Äthanol, 575 ml Xylol

2.6. Mikrobiologische Methoden (86)

2.6.1. Bestimmung des Zellwachstums

Das Wachstum der Bakterienkulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 420 nm mit einem Gilford Microsample Spectrophotometer verfolgt.

2.6.2. Aufbewahrung der Bakterienstämme

Bakterienzellen können für mehrere Jahre in 25 % Glycerin bei $-20^{o}C$ aufbewahrt werden.

2.6.3. Transduktion

2.6.3.1. Gewinnung von P1-Phagenlysaten

0,2 ml einer Bakterienkultur (10^9 Zellen) werden mit 5×10^6 Phagen und 2,5 ml P1-Weichagar ($50^{o}C$) vermischt und sofort auf eine frische P1-Platte ausgegossen. Ist nach 5 - 6 Stunden konfluente Lyse erreicht, wird der Weichagar mit einem Spatel in ein Zentrifugenglas überführt. Jede Platte wird mit 2 ml Medium 1 nachgespült und die Waschflüssigkeit mit dem Weichagar vereint. Nach Zugabe von 1 ml Chloroform wird mit einer Pipette gut durchgemischt. Anschließend trennt man die Phasen durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 10 Minuten). Der klare Überstand wird über Chloroform im Kühlschrank aufbewahrt (Phagentiter ca. 5×10^{10}/ml).

2.6.3.2. P1-Transduktion

Etwa 5×10^9 Bakterienzellen in 1 ml Medium 1 (+2,5 mM Ca^{2+}) werden mit 2×10^9 P1-Phagen vermischt. Nach 25 Minuten bei $37^{o}C$ wird ein weiteres Adsorbieren der Phagen durch Zugabe von 9 ml Puffer 1 verhindert. Man wäscht die Zellen zweimal mit Puffer 1 und streicht verschiedene Mengen (ca. 10^6 - 10^8 Zellen) auf selektive Platten aus.

2.6.3.3. Bestimmung des Phagentiters

0,1 ml einer genügend verdünnten Phagenlösung werden zu 2,5 ml P1-Weichagar ($50^{o}C$) und 0,2 ml einer Stationärkultur von Indikatorbakterien gegeben. Man gießt das Gemisch

sofort quantitativ auf eine P1-Platte aus. Die Platten werden bei 37°C inkubiert und die Plaques am nächsten Tag ausgezählt.
Bei der Bestimmung des Titers der M13-amber5-H3-Phagen wurde der Stamm K37(Su_I^+)-S26Rle als permissiver Indikatorstamm verwendet. Zur Überprüfung des Genotyps der Phagen wurden Kontrollplattierungen mit dem nicht permissiven Stamm K38-(Su_I^-)-S26 durchgeführt.

2.6.4. Konjugation

2.6.4.1. Hfr-Kreuzung

Je 0,5 ml einer gut belüfteten Exponentialkultur von Donor (ca. 5 x 10^7 Zellen/ml) und Rezipient (ca. 2 x 10^8 Zellen/ml) werden in einem vorgewärmten Erlenmeyerkolben vermischt und bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Nach der gewünschten Kreuzungszeit nimmt man die Zellen in Puffer 1 auf und homogenisiert gut durch. Verschiedene Zellmengen werden auf selektive Platten ausgestrichen.

2.6.4.2. F-Duktion

Je 0,5 ml einer exponentiell wachsenden Kultur des Donors und des Rezipienten werden in einem Erlenmeyerkolben vermischt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wird auf selektive Platten ausgestrichen.

2.6.4.3. Kurierung von F-Teilchen

Die Replikation von Episomen kann man durch Behandlung mit Acridinorange selektiv inhibieren. Verschiedene Bakterienstämme unterscheiden sich in der Sensitivität gegenüber dieser Substanz. Stark verdünnte Bakterienkulturen (ca. 10^5 Zellen/ml) werden bei pH 7,6 in Medium 1 im Dunkeln mit verschiedenen Mengen an Acridinorange (20 /ug/ml bis 200 /ug/ml Endkonzentration) inkubiert. Nach ca. 48 Stunden wird die Probe mit der höchsten Konzentration an Acridinorange, bei der die Bakterien noch gewachsen sind zur Analyse der Segreganten verwendet. Im allgemeinen haben 70 - 95 % der analysierten Clone ihr F-Teilchen ver-

loren.

2.6.5. Routinemäßige Überprüfung des cls-Phänotyps

Zu exponentiell in 10 ml Medium 4 mit den notwendigen Supplementen wachsenden Zellen (optische Dichte 0,5) werden 10 /uCi $^{32}P_i$ gegeben. Nach zweistündiger Inkubation extrahiert man die Lipide und trennt sie dünnschichtchromatographisch auf (Laufmittel 1, siehe 2.8.3.). Der Cardiolipingehalt der Proben wird durch Autoradiographie überprüft (siehe 2.8.5.).

2.6.6. Isolierung Tryptophan-auxotropher Mutanten

2.6.6.1. Nitritmutagenese

Etwa 10^{10} Bakterienzellen werden mit 0,5 M Acetatpuffer (pH 4,6) gewaschen und in 5 ml einer frisch im gleichen Puffer angesetzten Natriumnitritlösung (0,025 M) aufgenommen. Nach verschiedenen Inkubationszeiten bei 37°C (0, 10, 13, 16, 19 Minuten) werden Proben von je 0,5 ml zu 9,5 ml Puffer 1 pipettiert. Der Titer der überlebenden Zellen wird durch Plattierung ermittelt. Die mutagenisierten Bakterien zieht man nach zweimaligem Waschen mit Puffer 1 bis zur Stationärphase in einem Medium mit Tryptophan-Supplement an. Die Probe, die einer Inaktivierung von 99,9 % am nächsten kommt, wird zur Ampicillin-Selektion verwendet.

2.6.6.2. Ampicillin-Selektion

Ampicillin ist ein bakterizides Agens, das wachsende Zellen abtötet. Zur Anreicherung von Tryptophan-auxotrophen Mutanten wird eine Kultur mutagenisierter Bakterien zweimal mit Puffer 1 gewaschen. Die Zellen werden in Medium 2 mit allen benötigten Wuchsstoffen und allen Aminosäuren außer Tryptophan aufgenommen. Wenn die optische Dichte der Kultur um etwa das Fünffache zugenommen hat, verdünnt man sie im gleichen Medium auf eine Zelldichte von etwa 10^7 Zellen/ml. Anschließend wird die Kultur geteilt, Ampicillin (20 /ug/ml Endkonzentration) zu dem einen Teil zu-

gegeben und weiter inkubiert. Ist die Trübung in der Kontrollkultur ohne Ampicillin um das Fünf- bis Zehnfache angestiegen, so werden die mit Ampicillin behandelten Bakterien zweimal mit Puffer 1 gewaschen und auf Tryptophan-haltige Medium2-Platten ausgestrichen. Platten, bei denen 50 bis 300 Kolonien gewachsen sind, werden zum Überstempeln auf Platten ohne Tryptophan verwendet.

2.6.7. Isolierung von Rifampicin-resistenten Mutanten

Rifampicin-resistente Mutanten haben eine gegenüber dem Wildtyp veränderte RNS-Polymerase. Die für die Ausbildung der Resistenz verantwortliche Mutation (rpoB) kartiert bei min 89 auf dem E.coli-Chromosom (6). Zur Isolierung resistenter Stämme streicht man 0,1 ml einer Stationärkultur auf frische Medium 1-Platten mit 100 µg/ml Rifampicin aus. Bei Inkubation im Dunkeln wachsen im allgemeinen pro Platte etwa 10 Kolonien auf sauberem Untergrund. Diese werden zur Reinigung nochmals auf den gleichen Platten ausgestrichen.

2.6.8. Isolierung von Thymin-bedürftigen Mutanten

Bei Zusatz von Trimethoprim zum Medium haben Thymin-auxotrophe Baktrien einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Wildtyp. Zur Isolierung von thyA-Mutanten streicht man 0,1 ml einer Stationärkultur auf Medium 2-Platten mit 10 µg/ml Trimethoprim und 100 µg/ml Thymin aus. Clone, die auf diesen Platten wachsen, weisen nach Reinigung zum größten Teil den Genotyp $thyA^-$ auf. Diese Mutation kartiert bei min 56 auf dem E.coli-Chromosom (6).

2.7. Isolierung von Membranen und Analyse der Membranproteine

2.7.1. Gewinnung roher Membranfraktionen

Die Bakterien werden in Puffer 1 aufgenommen und bei 0 - 5°C mit einem Beschallstab 5 Minuten beschallt (Energieaufnahme 80 Watt). Größere Zelltrümmer entfernt man durch niedertourige Zentrifugation (20 Minuten, 1500 g). Der Überstand wird anschließend für 1 Stunde bei 300000 g zentrifugiert

und die sedimentierten Membranen noch einmal mit Puffer 1 gewaschen.

2.7.2. Trennung von cytoplasmatischer und äußerer Membran (95, 96)

10 g Zellen (Feuchtgewicht) werden in 100 ml 0,75 M Saccharose/10 mM TrisHCl (pH 7,8) bei 0°C aufgenommen. Zu der gut gerührten Suspension gibt man 20 mg Lysozym und 100 ml 20 mM NaEDTA (pH 7,5). In den nächsten Minuten entnimmt man kontinuierlich Proben und verfolgt mit dem Mikroskop die Sphäroplastenbildung. Ist diese weit fortgeschritten (bei gut geeigneten E.coli-Stämmen bis zu 90 % nach 20 Minuten), wird bei 0 - 5°C mit einem Beschallstab 3 Minuten beschallt (Energieaufnahme 80 Watt). Größere Zelltrümmer werden durch niedertourige Zentrifugation (1500 g, 20 Minuten) entfernt. Die im Überstand bleibenden Membranvesikel sedimentiert man durch hochtourige Zentrifugation (300000 g, 60 Minuten). Die so gewonnene rohe Membranfraktion wird in 0,25 M Saccharose/1 mM NaEDTA/3,3 mM TrisHCl (pH 7,8) aufgenommen und nochmals hochtourig abzentrifugiert. Mit dem in 6 ml 25 % Saccharose/0,5 mM NaEDTA (pH 7,5) resuspendierten Niederschlag überschichtet man anschließend einen Saccharose-Stufengradienten. Dieser besteht aus 6 Saccharoselösungen unterschiedlicher Dichte (1,5 ml 55 % und je 6 ml 50 %, 45 %, 40 %, 35 % und 30 % Saccharose in 0,5 mM NaEDTA (pH 7,5)). Den Gradienten zentrifugiert man für 24 Stunden bei 4°C mit 25000 rpm in einem Beckman SW27-Rotor. Die Membranvesikel teilen sich dabei in vier deutlich unterscheidbare Banden auf, die mit zunehmender Dichte als L1, L2, M und H-Bande bezeichnet werden. Die L-Banden enthalten hauptsächlich Fragmente der cytoplasmatischen Membran, die H-Bande Fragmente der äußeren Membran. Die Membranfraktionen werden nach dem Zapfen des Gradienten mit Puffer verdünnt, durch Zentrifugation gesammelt und über flüssigem Stickstoff gelagert.

2.7.3. Proteinbestimmung (75)

Proben mit einem Proteingehalt von 50 bis 250 µg werden in 1 ml H_2O aufgenommen, mit 0,1 ml Trichloressigsäure (3 M) versetzt und gut gemischt. Nach 5 Minuten wird das ausgefallene Protein abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 10 Minuten), der Überstand dekantiert und der Rückstand mit 0,5 ml NaOH (1 M) versetzt. Nach Zugabe von 5 ml Lösung A läßt man die Proben 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen, gibt 0,5 ml Lösung B zu und mischt sofort. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wird die Extinktion der Lösung bei 650 nm gegen einen Ansatz ohne Protein gemessen. Der Proteingehalt der Proben wird durch Bezug auf eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin ermittelt.

Lösung A: 1 ml Kupfersulfat (2 %)
1 ml Kaliumtartrat (4 %)
50 ml Natriumcarbonat (3 %)

Lösung B: 1 vol Wasser
1 vol Folinreagenz

2.7.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (73)

Das verwendete Polyacrylamidgel besteht aus einem Sammelgel und einem linearen Gradientengel aus 7 - 30 % Acrylamid. Das lineare Gradientengel (Lösung 1 und 2) wird mit Hilfe einer Gradienten-Mischapparatur gegossen.

Lösung 1 (7 % Acrylamid)
3 ml 30 % Acrylamid, 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid(Bis)
3 ml Lösung 3
6 ml Wasser
21 µl 10 % Ammoniumpersulfat
10 µl N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TMED)

Lösung 2 (30 % Acrylamid)
9 ml 40 % Acrylamid, 0,4 % Bis, 20 % Saccharose
3 ml Lösung 3 mit 20 % Saccharose
6 µl 10 % Ammoniumpersulfat
10 µl TMED

Lösung 3

1,5 M TrisHCl (pH 8,8), 0,4 % SDS

Lösung 4

0,5 M TrisHCl (pH 6,8), 0,4 % SDS

Lösung 5

10 ml Lösung 4
16 ml 10 % SDS
8 ml 20 % Glycerin
6 ml Wasser (2 % Mercaptoäthanol)

Sammelgel (2,5 % Acralamid)

6,6 ml Wasser
2,5 ml Lösung 4
0,85 ml 28,4 % Acrylamid, 1,6 % Bis
30 µl 10 % Ammoniumpersulfat
10 µl TMED

Elektrophoresepuffer

0,1 % SDS, 25 mM TrisGlycin (pH 8,6), 0,8 ml Mercaptoäthanol/l

Proben (ca. 50 µg Protein) werden in Lösung 5 aufgenommen und vor dem Auftragen mit etwas Markierungsfarbstoff (Bromphenolblau) versetzt.

2.7.4.1. Anfärbung der Gele

Färbelösung: 0,1 % Coomassie Brilliant Blue in Methanol/Essigsäure/Wasser 5:1:5 (v/v)
Entfärbelösung: Methanol/Essigsäure/Wasser 5:6:88 (v/v)

2.7.4.2. Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung

Einzelne Gelbahnen werden in 2 mm breite Abschnitte zerschnitten. Diese behandelt man für 2 Stunden bei 65°C mit 0,5 ml Protosol/Wasser 9:1. Anschließend werden die Proben mit 5 ml Tritosol-Scintillator versetzt und vor dem Auszählen eine halbe Stunde bei 37°C geschüttelt.

2.7.5. Bestimmung der Aktivität der NADH-Oxidase (95)

Das Inkubationsgemisch (1 ml) für den Enzymtest enthält

TrisHCl (50 mM, pH 7,5), NADH (0,12 mM), Dithioerythrit (0,2 mM) und je nach spezifischer Aktivität 1 - 100 µg Membranprotein. Man verfolgt die Abnahme der Absorption bei 340 nm. Cyanid (10 mM) soll die Reaktion vollständig inhibieren.

2.8. Isolierung und Analyse der Membranlipide

2.8.1. Extraktion der Lipide (2, 10)

Man suspendiert die Bakterien in einem einphasigen Gemisch aus Methanol/Chloroform/Wasser 20:10:8 (v/v). Bei größeren Zellmengen muß der Wassergehalt der Bakterien (ca. 80 % des Naßgewichts) berücksichtigt werden. Zu 28 ml der Suspension gibt man nach einer halben Stunde 10 ml Wasser und 10 ml Chloroform. Nach kurzer Zentrifugation wird die sich abscheidende organische Unterphase abgetrennt und mit Wasser oder einer Salzlösung (2 M KCl, 2 mM EDTA, pH 6,5) gewaschen. Kleine Mengen radioaktiv markierter Lipide extrahiert man nach Zugabe von Trägerlipid (24).

2.8.2. Säulenchromatographische Trennung der Phospholipide (30)

Carboxymethylcellulose(Whatman CM52) wird in Methanol suspendiert und in mehreren Portionsschritten in eine Säule (Durchmesser 2,5 cm/Betthöhe 45 cm) gefüllt. Anschließend entfernt man das Methanol durch Elution mit 10 Bettvolumina Chloroform. Die Lipide (nicht mehr als 0,5 g) werden in Chloroform gelöst und mit einer Pipette aufgetragen. Die Neutrallipide sollte man zuvor aus dem Gesamtextrakt entfernen. Dazu wird der Rohextrakt in wenig Chloroform aufgenommen und mit mindestens der zehnfachen Menge an Aceton versetzt. Die ausgefallenen Phospholipide können durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand dekantiert werden. In Tabelle 1 ist angegeben, mit welchem Chloroform-Methanol-Gemisch die verschiedenen Lipidkomponenten zu eluieren sind.

Tabelle 1: Elution der Phospholipide

Eluiertes Lipid	Vol % Methanol in Chloroform
Neutrallipide	0
PE	10
PG	19
CL	23

Durch Erhöhung der Methanolkonzentration über das zur Ablösung vom Ionenaustauscher strikt notwendige Maß hinaus, lassen sich die Elutionsvolumina (im allgemeinen über 10 Bettvolumina pro Elutionsschritt) senken. Die Flußrate sollte nicht mehr als 250 ml/Stunde betragen. Die Trennungen variierten etwas mit Menge und Zusammensetzung der aufgetragenen E.coli-Lipide. Der Verlauf der Elution wurde durch Dünnschichtchromatographie der Proben verfolgt.

2.8.3. Dünnschichtchromatographische Trennung der Lipide

2.8.3.1. Laufmittel (2)

1: Chloroform/Methanol/Essigsäure 65:25:10 (v/v)
2: Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v)
3: Chloroform/Methanol/Wasser/konz. Ammoniak 70:30:4:2 (v/v)
Es wurden Kieselgeldünnschichtplatten der Fa. Merck (Kieselgel 60, 0,25 mm Schichtdicke) verwendet. Die besten Trennergebnisse wurden mit Laufmittel 1 erzielt. Die Trennung ließ sich durch Aktivierung der Dünnschichtplatten (20 Minuten bei 120°C) optimieren. Danach ergaben sich folgende R_f-Werte: CL 0,7/PG 0,55/PE 0,4/PS 0,25.
Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie: Hierbei wird Laufmittel 3 in der ersten und Laufmittel 1 in der zweiten Laufrichtung verwendet.

2.8.3.2. Anfärbung der Chromatogramme

Ninhydrinreagenz: Aminogruppennachweis
0,25 g Ninhydrin werden in 100 ml Aceton/Lutidin 9:1 (v/v) gelöst. Nach dem Ansprühen werden die Platten für einige Minuten auf 120°C erwärmt.

Phosphatreagenz:
Reagenz 1: 40 g MoO_3 werden in 1 l Schwefelsäure (25 N) gekocht, bis die Lösung blaugrün ist.
Reagenz 2: 1,8 g Molybdän werden in 500 ml Reagenz 1 15 Minuten gekocht.
Gleiche Volumina von Reagenz 1 und 2 werden mit zwei Volumenteilen Wasser vermischt. Beim Ansprühen der Chromatogramme mit dieser Lösung färben sich organische Phosphorsäureester blau an.

Jodkammer:
Die Chromatogramme werden in einer abgeschlossenen Kammer für einige Minuten mit Joddampf behandelt. Die Lipidbanden färben sich braun an.

2.8.4. Deacylierung der Phospholipide

2.8.4.1. Milde alkalische Deacylierung (71)

Die Lipide (1 mg oder eine kleinere Menge an radioaktiv markierten Phosphatiden) werden in einem Gemisch aus 0,2 ml Chloroform, 0,3 ml Methanol und 0,5 ml methanolischer NaOH (0,2 M) gelöst. Nach 15 Minuten bei Raumtemperatur gibt man 0,2 ml Methanol, 0,8 ml Chloroform und 0,9 ml Wasser zu. Nach kurzer Zentrifugation wird die wässrige Oberphase mit einer Pasteurpipette abgetrennt und durch Zugabe einer kleinen Menge von Dowex 50 (H^+)-Ionenaustauscher neutralisiert. Anschließend engt man den wässrigen Extrakt bei 35°C im Stickstoffstrom stark ein und trennt die Deacylierungsprodukte dünnschichtchromatographisch auf.

2.8.4.2. Dünnschichtchromatographie der Deacylierungsprodukte (71, 153)

Platten: Cellulose-Dünnschichtplatten (Merck, 0,1 mm Schichtdicke).

Laufmittel A: Äthanol/0,5 M Ammoniumacetat in H_2O (pH 7,5) 7:3 (v/v)

Laufmittel B: Phenol/Wasser 100:38 (w/w)

Tabelle 2: Dünnschichtchromatographie der Deacylierungsprodukte

Lipid	Deacylierungsprodukt	Laufm.A R_f	Laufm.B R_f
PG	Glycerylphosphorylglycerin	0,56	0,48
PE	Glycerylphosphoryläthanolamin	0,44	0,58
CL	bis-Glyceryl-Glycerindiphosphat	0,29	0,22

2.8.4.3. Anfärbung der Chromatogramme

Aminogruppen: Ninhydrinreagenz (siehe 2.8.3.2.)
Vicinale Hydroxylgruppen (152):
Die Platten werden zunächst mit Lösung 1 und 5 Minuten später mit Lösung 2 besprüht. Positive Substanzflecken erscheinen gelb auf blaugrünem Untergrund.
Lösung 1: Natriumperjodat (0,16 M) in Aceton/Wasser 95:5
Lösung 2: o-Tolidin (0,01 M) und Essigsäure (0,1 M) in Aceton/Wasser 95:5

2.8.5. Nachweis und Quantifizierung radioaktiv markierter Lipide

2.8.5.1. Autoradiographie

Durch Auflegen eines Röntgenfilmes (Kodak X-Omat S) kann man die Verteilung radioaktiv markierter Lipide auf entwickelten Chromatogrammen halbquantitativ erfassen. Bei einer ^{32}P-Aktivität von 10000 dpm pro Substanzfleck sollten die Filme etwa einen Tag lang exponiert werden.

2.8.5.2. Bestimmung der Zusammensetzung radioaktiv markierter Lipidproben

Die Lipide werden dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (Laufmittel 1, siehe 2.8.3.1.). Anschließend lokalisiert man die Substanzflecken durch Behandlung mit Joddampf oder durch Autoradiographie und kratzt sie mit einem Spatel aus. Das Kieselgel wird direkt ins Scintillatorgläschen überführt und mit 5 ml Tritosol-Scintillator versetzt.

2.8.6. Phosphatbestimmung

Die Proben (Phosphatgehalt 50 bis 500 nMol) werden in 0,4 ml Perchlorsäure (72 %) aufgenommen und 2 Minuten über der Bunsenbrennerflamme bis zum Kochen erhitzt. Danach werden 2 ml bidestilliertes Wasser und 0,2 ml Ammoniummolybdatlösung (5 %) zugegeben. Nach gutem Mischen setzt man 0,5 ml einer frisch angesetzten Ascorbinsäurelösung (10 %) zu und läßt das Gemisch 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen. Danach mißt man die Absorption bei 680 nm gegen einen Parallelansatz ohne Phosphat. Der Phosphatgehalt der Proben wird durch Bezug auf eine Eichkurve ermittelt. Wenn zur Quantifizierung des Phosphatgehaltes Lipidflecke aus Dünnschichtchromatogrammen ausgekratzt wurden, sedimentiert man das Kieselgel direkt vor der Messung durch Zentrifugation. Alle Geräte müssen vor Gebrauch mit Waschflüssigkeit (5 % Ammoniummolybdat in 1 M H_2SO_4) gereinigt und mehrere Male mit bidestilliertem Wasser gespült werden. Alle Lösungen werden in bidestilliertem Wasser angesetzt.

2.8.7. Identifizierung der Glycerophosphatide

A. Dünnschichtchromatographie: Vergleich der Laufstrecke mit Standardsubstanzen nach Entwicklung mit verschiedenen Laufmitteln
   Aa. Lipide
   Ab. Deacylierungsprodukte
B. Spezifische Anfärbung auf den Chromatogrammen

Standardsubstanzen:

Lyso-PE (Dipalmitoyl)	Serdary
PS (aus Rinderhirn)	Sigma
PG (enzymatisch aus Eilecithin)	Sigma
PE (Dimyristyroyl)	Fluka
CL (aus *E.coli*)	Dr. M. Happe

2.8.8. Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung der Lipide

2.8.8.1. Darstellung der Fettsäuremethylester

Die Lipide (einige mg) werden in 2 ml methanolischer KOH (15 %) bei 60°C 3 Stunden verseift. Nach Zugabe von 1 ml HCl (6 N) und 1,5 ml Wasser werden die Fettsäuren zweimal mit je 2 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Unterphasen werden mit Wasser gewaschen und anschließend mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels tropft man bei 0°C so lange Diazomethan in Äther zu, bis eine Gelbfärbung bestehen bleibt. Nach einigen Minuten wird der Äther abgedampft und die Fettsäuremethylester in Aceton aufgenommen.

2.8.8.2. Gaschromatographische Trennung der Methylester

Säule 1: 15 % Apiezon L auf Gaschrom P/220°C/isoth.
Säule 2: 15 % DEGS auf Gaschrom P/190°C/isoth.
Trägergas: Argon

2.8.8.3. Identifizierung der Methylester (71)

Standardsubstanzen: Fettsäuremethylester in n-Heptan (Packard Instrument Co.) zum Vergleich der Retentionszeiten.
Ungesättigte und Cyclopropan-Fettsäuren zeigen auf der polaren Säule 2 größere und auf der nicht-polaren Säule 1 kleinere Retentionszeiten als die korrespondierenden gesättigten Fettsäuren.

A. Katalytische Hydrierung
Die Fettsäuren (ca. 1 mg) werden in 1 ml Methanol aufgenommen. Nach Zugabe von 5 mg PtO_2 hydriert man für 15 Minuten mit durchperlendem Wasserstoff. Der Katalysator wird anschließend abzentrifugiert. Die Signale der ungesättigten Fettsäuren erscheinen nach der Hydrierung auf den Gaschromatogrammen bei der Position der korrespondierenden gesättigten Fettsäuren. Die Signale der Cyclopropan-Fettsäuren bleiben unverändert.

B. Bromierung der Fettsäuremethylester
Proben von ca. 1 mg (hydriert und nicht hydriert) werden in 0,2 ml Äthyläther (wasser- und peroxidfrei) aufgenommen. Man tropft ein Gemisch aus Brom und Äther 1:20 (v/v) zu, bis eine leichte Gelbfärbung bestehen bleibt. Durch die Bromierung verschwinden die Signale von ungesättigten und Cyclopropan-Fettsäuren.

C. Gaschromatographie/Massenspektroskopie
Apparatur: Varian MAT 311A direkt gekoppelt mit Aerograph 1400.
Säule: JAEGGI SE54/200°C/isoth.
Trägergas: Helium

2.8.8.4. Auswertung der Chromatogramme (71)

Der prozentuale Anteil einer Fettsäure am Gesamtgemisch ergibt sich nach der Formel:

$$\text{Anteil (Mol\%)} = \frac{hT/M}{\sum hT/M} \times 100$$

h = Signalhöhe
T = Retentionszeit
M = Molekulargewicht des Fettsäuremethylesters

2.8.9. Katalytische Hydrierung von Phospholipiden (27)

Die Lipide (einige mg) werden in 5 ml Tetrahydrofuran (peroxidfrei) gelöst und nach Entfernung freien Sauerstoffs mit 10 mg PtO_2 versetzt. Anschließend leitet man 1 Stunde lang Wasserstoff durch die Lösung. Vor dem Entfernen des Katalysators durch Zentrifugation wird der überschüssige Wasserstoff mit Stickstoff ausgetrieben.

2.8.10. Untersuchung von Lipidphasenumwandlungen (98)

Lipidphasenumwandlungen lassen sich mit einer Vielzahl von physikalischen Meßtechniken nachweisen (74). Fluoreszenzmessungen mit dem fluoreszierenden Farbstoff N-Phenyl-1-Naphthylamin(PhNap) als Indikator wurden im Rahmen dieser Arbeit zu routinemäßigen Untersuchungen der Lipidphasen-

umwandlung in Zellen eingesetzt. Der Übergang der Lipide in den flüssig-kristallinen Zustand führt zu einer Erhöhung der Quantenausbeute der Fluoreszenz. Aus der Zunahme der Fluoreszenzintensität kann man den Umwandlungsgrad der Lipide ermitteln (142).
ESR- und Fluoreszenzspektroskopie, Lichtstreuungsmessungen, Röntgenbeugungsuntersuchungen, Dilatometrie und Kalorimetrie haben in einer Vielzahl von Untersuchungen übereinstimmende Werte für die Umwandlungstemperatur T_t der Lipide in E.coli-Zellen, isolierten Membranen und Liposomen geliefert (98). Besonders bemerkenswert sind die Übereinstimmungen von PhNap-Fluoreszenzmessungen mit Röntgenbeugungsexperimenten, bei denen die Strukturänderungen der Lipide bei der Phasenumwandlung direkt erfaßt werden können (96).

2.8.10.1. PhNap-Fluoreszenzmessung

A. Zellen (139)
Eine Suspension frisch geernteter Zellen mit einer optischen Dichte von 1 wird mit PhNap (Endkonzentration 5×10^{-7} M) versetzt. Die Proben können einige Stunden bei $0^{o}C$ aufbewahrt werden, ohne daß Veränderungen der Phasenumwandlungskurven auftreten. Zur Messung der Fluoreszenzintensität wurden die Suspensionen in eine Küvette mit eintauchender Rührapparatur gefüllt. Das verwendete Hitachi-Perkin-Elmer-MPF3-Spektrofluorimeter wurde auf eine Anregungswellenlänge von 350 nm und eine Emissionswellenlänge von 420 nm eingestellt. Mit einem Hewlett-Packard-X-Y-Schreiber wurde die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Temperatur kontinuierlich registriert. Die X-Achse des Schreibers wurde dazu an ein direkt in die Küvette eintauchendes Thermoelement gekoppelt. Die Temperatur in der Küvette wurde zwischen 5 und $45^{o}C$ mit einer Geschwindigkeit von 1 bis $2^{o}C$ pro Minute verändert.
In Abb.14 ist erläutert, wie man aus den gemessenen Umwandlungskurven die Umwandlungstemperatur T_t, die Breite der Umwandlung und normalisierte Umwandlungskurven ermitteln kann.

B. Lipidvesikel

Vesikel aus den in Puffer 2 dispergierten Lipiden wurden durch Beschallung bei einer Temperatur oberhalb der Phasenumwandlung gewonnen. Unter Stickstoff wurden Proben von 4 ml (Lipidkonzentration 10^{-3} M) für 15 Minuten mit einem Beschallstab bei einer Energieaufnahme von 30 Watt beschallt. Anschließend wurden die Suspensionen auf das fünffache Volumen verdünnt und PhNap (Endkonzentration 5×10^{-6} M) zugegeben. Nach niedertouriger Zentrifugation wurde der Überstand in eine Meßküvette gegeben und die Fluorszenzintensität in Abhängigkeit von der Temperatur wie oben beschrieben gemessen.

PhNap-Stammlösung: 5×10^{-4} M in Methanol

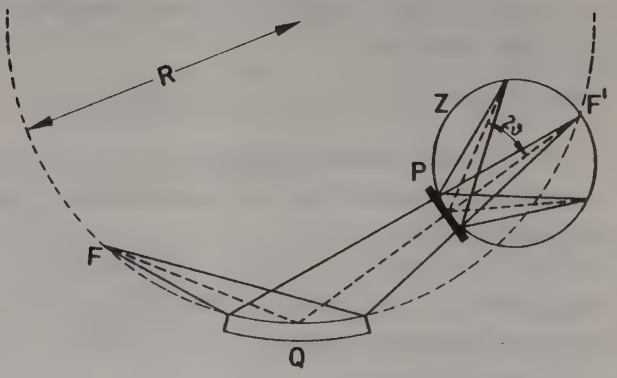
2.8.10.2. 90^{o}-Lichtstreuung

Lipidvesikel wurden wie oben beschrieben hergestellt und die Änderung der Lichtstreuung bei einer Wellenlänge von 400 nm (Anregung und Emission) in Abhängigkeit von der Temperatur mit der beschriebenen Meßanordnung aufgenommen. Die Auswertung der Spektren ist in Abb. 15 erläutert.

2.8.11. Röntgenbeugung

Die Röntgenbeugungsexperimente wurden mit einer Guinier-Kamera durchgeführt, die zur Vermeidung von Luftabsorption und -streuung in eine evakuierbare Kammer eingebaut war (siehe Abb. 3). Der Durchmesser der Kamera betrug 11,46 cm. Mit einem gebogenen Quarzkristall-Monochromator wurde die Kupfer-$K\alpha_1$-Linie(λ=1,5405 Å) ausgefiltert. Die Röntgenröhre mit einem Strich-Brennfleck von 0,4 x 8 mm wurde bei 50 kV und 20 mA betrieben.
Lipidproben (ca. 30 mg) wurden in einer thermostatisierbaren Metallhalterung zwischen Glimmerplättchen eingeschlossen. Als Abstandshalter dienten 3 mm dicke Teflonscheiben. Für die Belichtung der Röntgenfilme waren Zeiten zwischen 10 und 180 Minuten erforderlich. Die Beugungslinien auf den Filmen wurden mit einem Mikrodensitometer ausgewertet.

Abb. 3: Prinzip der Röntgenkamera mit Monochromator nach A. Guinier. Das von einem Strichbrennfleck F ausgehende divergente Röntgenstrahlbündel fällt auf einen mit Radius R zylindrisch gebogenen Quarzeinkristall Q und wird dort streng monochromatisch zur Fokallinie F' fokussiert. F' und Probe P liegen auf dem Rand (=Filmebene) der Zylinderkammer Z der Guinier-Kamera. Die unter dem Bragg'schen Winkel ϑ gebeugten Strahlen werden ebenfalls auf die Filmebene fokussiert.



2.8.12. Deuteriummagnetische Resonanzspektroskopie

Zellen

Zellen des Stammes T2GP (fabB, fadE, cls) wurden bei 40°C in Medium 7 mit Elaidinsäure als Supplement angezogen. Mittlere Fettsäurezusammensetzung: 85 % Elaidinsäure, 15 % gesättigte Fettsäuren (Mol%).

Für die Inkorporation von Palmitinsäure wurde aus dem Stamm T2GP durch Transduktion zur Prototrophie (Donor: K12Ymel) die Transduktante T106GP (fadE, cls) gewonnen. Zellen dieses Stammes wurden bei 37°C ohne Fettsäuresupplement in einem Medium mit den Salzen des Cohen-Rickenberg-Mediums (4), 0,3 % Casamino acids, 0,5 % Glycerin angezogen. Bei einer optischen Dichte von 0,1 wurde Brij 35 (0,5 %) und Palmitinsäure (0,01 %) zugegeben und die Zellen bei einer optischen Dichte von 2 geerntet.

Tabelle 3: Fettsäurezusammensetzung (Mol%) der Lipide des Stammes T106GP (Medium: CR-Salze, 0,3 % Casamino acids, 0,5 % Glycerin)

	16:0	sonstige gesättigte FS	ungesättigte und Cyclopropan-FS
Ohne Fettsäure-Supplement	29	19	52
mit Palmitat als Supplement	71	7	22

Die Zellen wurden nach dem Ernten viermal mit Puffer gewaschen (die beiden ersten Male mit Zusatz von 0,5 % Brij 35), bei -30°C gelagert, in ein 10 mm NMR-Röhrchen gefüllt und direkt vor der Messung aufgetaut.

Membranen.
Fraktionen der cytoplasmatischen (L1 und L2-Bande) und der äußeren Membran (H-Bande) wurden wie unter 2.7.2. beschrieben isoliert. Bis zur Abtrennung der Zelltrümmer wurden alle Schritte bei einer Temperatur von 35°C durchgeführt. Die spezifische Aktivität der NADH-Oxidase (2.7.5.) war in der Cytoplasmamembran-Fraktion etwa 20-mal höher als in der Fraktion der äußeren Membran. Die sedimentierten Membranen wurden über flüssigem Stickstoff gelagert.

Lipide
Die Lipide wurden wie unter 2.8.1. beschrieben extrahiert, über eine Kieselgel-Säule gereinigt, bei 50°C in Puffer suspendiert und abzentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen wurde der feuchte Niederschlag in ein NMR-Röhrchen überführt.

Die Messungen wurden bei 61,4 MHz mit einem supraleitenden Magneten durchgeführt (pulse width 16 /usec / spectral width 50 kHz / recycle time 0,15 sec).

3. Ergebnisse

3.1. Eigenschaften einer Mutante mit Defekt in der Cardiolipinsynthese

3.1.1. Kartierung des cls-Gens auf dem E.coli-Chromosom

Um Mutanten der Lipidsynthese zu gewinnen, habe ich in meiner Diplomarbeit (105) die Phospholipidsynthese von 200 temperatursensitiven Mutanten mit unbekannten Gendefekten bei nicht-permissiver Temperatur untersucht. Einer der untersuchten Stämme, HI310, wies einen Defekt in der Synthese von Cardiolipin auf. Dem defekten Gen wurde der systematische Name cls (cardiolipinsynthesis) gegeben.
Die untersuchten Stämme gehörten zu einer Kollektion von Mutanten, die von Y. Hirota durch Nitrosoguanidin-Mutagenese aus dem E.coli K12-Derivat PA3092 hergestellt worden waren. Infolge der harten Mutagenese tragen diese Bakterien multiple Mutationen (67).
Bevor der Phänotyp der cls-Mutation untersucht werden konnte, mußte sie von weiteren durch die Nitrosoguanidin-Behandlung hervorgerufenen Mutationen getrennt werden. Um das defekte cls-Gen in Stämme mit definiertem Genotyp übertragen zu können, wurde seine Lage auf dem E.coli-Chromosom bestimmt.
Im Verlauf der Kartierung stellte sich heraus, daß die cls-Mutation mit keinem leicht zu überprüfenden Phänotyp verknüpft ist. Der Genotyp von Rekombinanten konnte daher nicht durch einen einfachen Test (z.B. Replika-Plattierung) überprüft werden. Mit jedem der zu untersuchenden Stämme wurde stattdessen ein $^{32}P_i$-Einbau durchgeführt und der Cardiolipingehalt nach dünnschichtchromatographischer Trennung der Lipide durch Autoradiographie bestimmt (siehe 2.6.5.). Bei jedem Schritt der Kartierung konnte daher jeweils nur eine begrenzte Anzahl von Rekombinanten überprüft werden.

3.1.1.1. Unabhängigkeit der cls-Mutation von dem temperatursensitiven Phänotyp des Stammes HI310

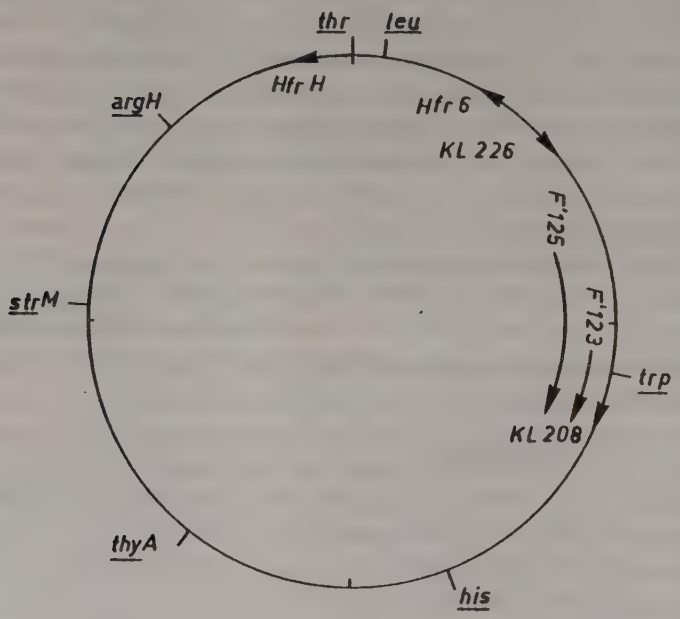
In Vollmedium 1 war der Stamm HI310 bei 30°C, nicht aber bei 42°C zu kontinuierlichem Wachstum fähig. Die Zellen enthielten sowohl nach Wachstumsstop bei hoher Temperatur als auch bei

exponentiellem Wachstum bei permissiver Temperatur nur geringe Spuren von Cardiolipin. Durch P1-Transduktion (siehe 2.6.3.) mit Stamm K12Ymel als Donor konnten 5 Rekombinanten gewonnen werden, die die Fähigkeit zum Wachstum bei 42°C zurückgewonnen hatten. Der Cardiolipingehalt der Lipide war bei diesen Stämmen unverändert gering. Der temperatursensitive Phänotyp des Ausgangsstammes HI310 ist folglich nicht auf den Defekt in der Cardiolipinsynthese, sondern auf eine zweite, hier nicht näher untersuchte Mutation zurückzuführen.
Die temperaturresistenten Transduktanten wuchsen nicht auf Minimalmedium 2-Platten mit den Wuchsstoffen des Stammes PA3092. Es konnte aber eine Transduktante (Donor: K12Ymel) isoliert werden, die zum Wachstum auf diesen Platten fähig war. Dieser Stamm, T12GP, enthielt auch weiterhin das defekte *cls*$^-$-Allel.
Bei den folgenden Experimenten wurden im allgemeinen Medium 2-Platten mit den Wuchsstoffen für die jeweils nicht selektionierten Marken verwendet. Bei Kreuzungs-Experimenten wurde den Nährböden zur Gegenselektion Streptomycin (100 mg/l) beigegeben.

3.1.1.2. Hfr-Kreuzungen

Verschiedene Hfr-Kreuzungen dienten zur groben Lokalisierung der *cls*-Mutation auf dem *E.coli*-Chromosom. Zuerst wurde der polyauxotrophe Stamm T12GP (*cls*, *thr*, *leu*, *trp*, *his*, *thyA*, *argH*, *strM*) mit HfrH gekreuzt (siehe 2.6.4.). Nach zwei Stunden bei 37°C wurde das Kreuzungsgemisch auf selektive Platten ausgestrichen. Dabei wurde auf eine oder mehrere Auxotrophiemarken selektioniert und die nicht selektionierte Marke *cls* jeweils bei etwa 10 Rekombinanten überprüft.
Tryptophan-prototrophe Rekombinanten wiesen im allgemeinen den Genotyp *cls*$^+$ auf. Stämme, die für einen der anderen in Abb. 4 aufgeführten Wuchsstoffe prototroph geworden waren, enthielten zum größten Teil weiter das *cls*$^-$-Allel. Hinweise auf eine enge Nachbarschaft von *cls*-Gen und Tryptophanoperon ergaben sich auch bei weiteren Hfr-Kreuzungen, bei denen Hfr-Stämme mit nahe beim Tryptophanoperon gelegenen Startstel-

Abb. 4: Lokalisation von Auxotrophie-Marken (argH, his, leu, thr, thyA, trp: Auxotrophie für Arginin, Histidin, Threonin, Thymin und Tryptophan) des Stammes PA3092 auf dem E.coli-Chromosom (6). Ursprung und Richtung des Chromosomentransfers durch Hfr-Stämme sind durch Pfeile angezeigt. Grenzen der Episomen sind der Aufstellung von Brooks-Low (15) entnommen.



len des Chromosomentransfers verwendet wurden (siehe Abb. 4). Durch Reduktion der Kreuzungsdauer auf eine halbe Stunde war dabei das Ausmaß der DNA-Übertragung auf maximal ein Drittel des E.coli-Chromosoms limitiert worden. Die in Tabelle 4 beschriebenen Ergebnisse lokalisieren das cls-Gen zwischen Minute 12 und Minute 32 auf dem E.coli-Chromosom.

Tabelle 4: Kreuzung des Stammes T12GP mit verschiedenen Hfr-Stämmen

Hfr-Stamm	Startstelle des Chromosomentransfers	selektionierte Marke	cls^+	cls^-
KL226	12 min	thr^+, leu^+	0	10
Hfr6	8 min	trp^+	9	1
KL208	32 min	trp^+	10	0

3.1.1.3. F'-Kreuzungen; Rezessivität der cls-Mutation

Mit Hilfe von F-Duktionsexperimenten konnten die beschriebenen Ergebnisse zur Kartierung noch präzisiert werden. Die in den übertragenen F'-Faktoren integrierten Abschnitte des E.coli-Chromosoms sind in Abb. 4 gezeigt.

Kreuzungen: Donor: KLF25 (enthält F'125) oder
KLF23 (enthält F'123)
relevante chromosomale Marke: his
Rezipient: T17GP (cls, trp, thi, thy)
Ursprung dieses Stammes: siehe 2.4.
Selektion: trp^+, his^+-Derivate

Tryptophan-prototrophe Heterogenoten des Stammes T17GP hatten nach Einführung beider F'-Faktoren die Fähigkeit zur Cardiolipinsynthese rückgewonnen. Aus den Heterogenoten ließen sich durch Behandlung mit Acridinorange (siehe 2.6.4.3.) wieder Tryptophan-auxotrophe Segreganten (trp, cls)gewinnen.
Dieses Ergebnis zeigt, daß cls^- sich rezessiv zum Wildtyp-Allel cls^+ verhält. Das cls-Gen muß auf dem kurzen Abschnitt des E.coli-Chromosoms liegen, der in dem F'-Faktor F123 integriert ist. Die Lagebestimmung des cls-Gens durch Kreuzungsexperimente war damit genau genug, um mit Aussicht auf Erfolg Cotransduktionsversuche anzuschließen, bei denen DNA-Fragmente übertragen werden, die maximal 2 % des E.coli-Chromosoms umfassen.

3.1.1.4. Übertragung des cls^--Allels in Stämme mit definiertem Genotyp durch P1-Transduktion

Weder mit dem Stamm T12GP noch mit den Ausgangsstämmen HI310

und PA3092 konnten P1-Phagenlysate gewonnen werden. Gleichzeitig waren auch bei Transduktionsexperimenten mit diesen Stämmen als Rezipienten die Transduktionsfrequenzen äußerst gering. Bevor das defekte cls-Allel durch Transduktion übertragen werden konnte, mußte daher durch Konjugation eine Phagen-sensitive Rekombinante des Stammes T12GP gewonnen werden.

Kreuzung: Donor: HfrH
Rezipient: T12GP
Selektion: thr^+, leu^+, arg^+, strM-Rekombinanten

Eine von 15 untersuchten Rekombinanten war phagensensitiv: T13GP (cls, trp, thyA, thi, his, strM). Sie wurde mit P1-Phagen aus Wildtyp-Zellen behandelt. Drei von zehn untersuchten Tryptophan-prototrophen Transduktanten hatten das Wildtyp-cls^+-Allel erhalten. Aus einer der Transduktanten, T14GP (cls, thyA, his, thi) wurde ein P1-Lysat hergestellt. Bei Cotransduktionsexperimenten mit diesem Lysat konnte das mutierte cls^--Allel zusammen mit dem Wildtyp-trp^+-Allel auf verschiedene Tryptophan-prototrophe Rezipienten übertragen werden. Diese Stämme dienten im folgenden zur phänotypischen Charakterisierung der cls-Mutation. Die Cotransduktionsfrequenzen von 35 - 55 % entsprechen einem Abstand zwischen cls-Gen und trp-Operon von ca. einer halben Minute auf dem E.coli-Chromosom.

3.1.1.5. Das cls-Gen liegt zwischen attØ80 und tyrT auf dem E.coli-Chromosom

Weitere Transduktionsexperimente und die Untersuchung von Deletionsmutanten lieferten Daten für eine genaue Lokalisation des cls-Gens (siehe auch Abb. 5)

Im ersten dieser Transduktionsexperimente wurde der Stamm T1GP (trp^+, cls^-, $hemA^+$) als P1-Donor und Stamm A201 (trp^-, cls^+, $hemA^-$) als Rezipient verwendet. Alle fünf untersuchten trp^+ $hemA^+$-Rekombinanten hatten das cls^--Allel erhalten.

Beim zweiten Transduktionsexperiment diente Hfr3000YA149 ($pyrF^-$, trp^+, cls^+) als Rezipient und Stamm T13GP ($pyrF^+$, trp^-, cls^-) als P1-Donor. Alle fünf untersuchten $pyrF^+trp^-$-

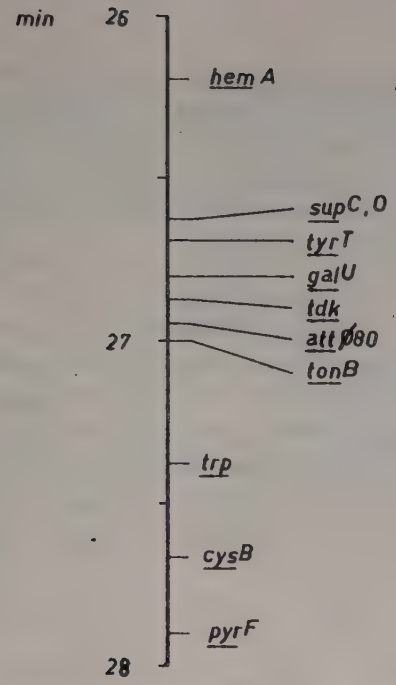
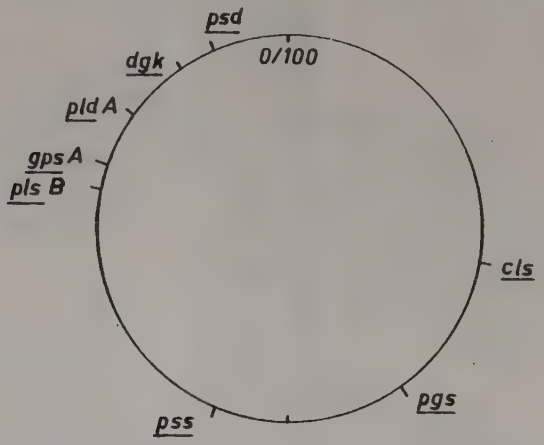


Abb. 5: Ausschnitt aus der Genkarte von E.coli K12 (6).

Rekombinanten enthielten weiter das cls$^+$-Allel.
Der Stamm W3110Δ(tonB, trp)AE1, der ausgehend von attØ80 eine tonBtrp-Deletion enthält, die zwischen trp und cysB endet, ist cls$^+$.
Die Stämme MCI172Δ(galU-attØ80)-31 und MCI176Δ(galU-attØ80)-45, die ausgehend von attØ80 galUtdk-Deletionen enthalten, synthetisieren im Gegensatz zum Ausgangsstamm MCI176/λattØ80 nur Spuren von Cardiolipin. Wie bei Stämmen, die das in dieser Arbeit beschriebene cls$^-$-Allel enthalten, kommt es bei diesen Deletionsmutanten in der Stationärphase zu einer langsamen Akkumulation kleiner Cardiolipinmengen. Die Identität des akkumulierenden Lipids mit Cardiolipin wurde durch Deacylierung und Chromatographie der Deacylierungsprodukte in verschiedenen Laufmitteln (siehe 2.8.4.2.) eindeutig nachgewiesen.

Die beschriebenen Experimente zur Feinkartierung sprechen übereinstimmend für eine Lokalisation des cls-Gens zwischen den Marken attØ80 und tyrT (siehe Abb. 5).

Abb. 6: Lokalisation von Mutationen des Lipidstoffwechsels auf dem E.coli-Chromosom (6, 109). Veränderte Enzymaktivitäten: cls Cardiolipinsynthese; dgk Diglyceridkinase; gpsA Glycerinphosphat-Dehydrogenase; pgs PGP-Synthase (in vitro); pldA Phospholipase A; plsB Glycerinphosphat-Acyltransferase; psd PS-Decarboxylase; pss PS-Synthase



3.1.1.6. Natur der cls-Mutation

Das cls-Gen kartiert weit entfernt von allen bisher beschriebenen Mutationen des Phospholipidstoffwechsels (siehe Abb. 6) bei Minute 27 auf dem E.coli-Chromosom.

Über die Natur der cls-Mutation kann anhand der bisher gewonnenen Ergebnisse (Rezessivität (3.1.1.3.), Defekt in der Cardiolipinsynthese in vitro (3.1.2.1.) geringe Restsyntheserate bei Deletionsmutanten in vivo (3.1.1.5.)) keine sichere Aussage gemacht werden. Möglicherweise ist das cls-Gen das Strukturgen der Cardiolipinsynthase. In diesem Falle würde die geringe Restsynthese in den Deletionsmutanten auf die Existenz eines alternativen Stoffwechselweges hindeuten.

In Bakterien und höheren Organismen existieren zwei verschiedene Reaktionsmechanismen für die Synthese von Cardiolipin.

Mechanismus 1: PG + CDP-Diglycerid $\longrightarrow$ CL + CMP

Mechanismus 2: 2 PG $\longrightarrow$ CL + Glycerin

Während in Mitochondrien der Mechanismus 1 verwirklicht ist (65), haben Untersuchungen in vivo (77, 112) und in vitro

(58, 62) gezeigt, daß bei E.coli zumindest der größte Teil des Cardiolipins nach Mechanismus 2 entsteht. Hostetler et al. fanden indirekte Hinweise dafür, daß E.coli-Membranfraktionen bei hohen CDP-Diglycerid-Konzentrationen auch die Reaktion 1 katalysieren (62).
Möglicherweise entstehen in den Deletionsmutanten geringe Cardiolipinmengen nach diesem Mechanismus oder als Nebenprodukt eines anderen Reaktionsweges. Diese Frage muß zunächst offen bleiben, da die Cardiolipinsyntheseaktivität in den Deletionsmutanten für mechanistische Untersuchungen zu gering ist. Denkbar ist aber auch, daß das cls-Gen nicht das Strukturgen der Cardiolipinsynthase, sondern ein Regulatorgen ist. Zieht man die Dominanz des cls^+-Allels in Betracht, so müßte das hypothetische Genprodukt ein Aktivator der Cardiolipinsynthase sein.

3.1.2.1. Wachstum, Lipidzusammenstzung und Aktivität der Cardiolipinsynthase

Die Experimente, die zu den hier unter 3.1.2.1. geschilderten Ergebnissen führten, habe ich bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit (105) beschrieben. Zum besseren Verständnis der folgenden Untersuchungen gebe ich einige wichtige Fakten an dieser Stelle nochmals wieder.

A. Wachstum

Die cls-Mutation wirkt sich weder bei hoher noch bei niederer Temperatur auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Bakterien aus. Dies gilt für Vollmedien wie auch für Minimalmedien mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (Glucose, Lactose, Mannitol, Glycerin oder Succinat).

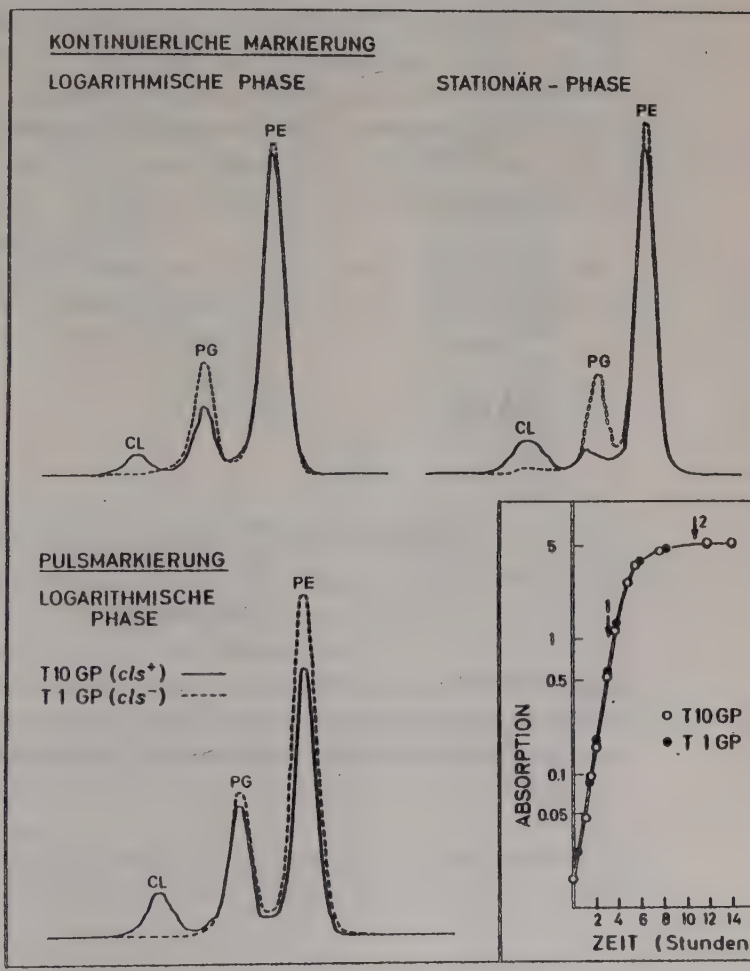
B. Lipidzusammensetzung

Die cls-Mutation ruft sowohl bei niederer als auch bei hoher Wachstumstemperatur in vivo und in vitro einen Defekt in der Cardiolipinsynthese hervor.

In Abb. 7 ist gezeigt, wie sich die Phospholipidzusammensetzung einer cls^--Mutante (T1GP) von der eines isogenen Kontrollstammes mit Wildtyp-cls^+-Allel (T10GP) unterscheidet. Exponentiell wachsende Zellen des Stammes T10GP enthalten 79 % PE, 15 % PG und 6 % CL (Mol% P_i), Zellen des Stammes T1GP 75 % PE, 25 % PG und weniger als 0,4 % CL (Abb. 7, oben links). Von besonderer Bedeutung für die weiter unten (3.2.) beschriebenen Experimente ist, daß die Reduktion des CL-Gehalts in der cls-Mutante von einer Erhöhung des PG-Gehalts begleitet ist.

In der Stationärphase wandeln die Zellen des Stammes T10GP den größten Teil des PG in CL um (Abb. 7, oben rechts). Bei Stamm T1GP entstehen dagegen nur kleine Mengen an CL

Abb. 7: Phospholipidzusammensetzung von Wildtyp (Stamm T10GP) und Mutante (Stamm T1GP). Experimentelle Einzelheiten: siehe Diplomarbeit (105). Die Zellen wurden in Anwesenheit von $^{32}P_i$ angezogen und in exponentieller bzw. stationärer Phase geerntet. Anschließend wurden die Phospholipide extrahiert, dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und die Radioaktivitätsverteilung auf den Chromatogrammen mit Hilfe eines Chromatogramm-Scanners ausgewertet. Rechts unten sind die Wachstumskurven der Kulturen angegeben; Pfeile zeigen die Zeitpunkte für die Entnahme von Proben an. Links unten ist die Radioaktivitätsverteilung nach Pulsmarkierung (30 Minuten) gezeigt.



C. Aktivität der Cardiolipinsynthase

In E.coli-Zellen entsteht zumindest der größte Teil des CL über eine Transphosphatidylierungsreaktion aus zwei Molekülen PG (58, 62). Die Cardiolipinsynthase ist in der cytoplasmatischen Membran lokalisiert (9). In Abb. 8 ist der zeitliche Verlauf der Synthese von radioaktiv markiertem CL aus ^{32}P-PG durch rohe Membranfraktionen in Anwesenheit von Detergenz gezeigt. Man sieht, daß bei der Mutante (T1GP) die Aktivität der Cardiolipinsynthase im Vergleich zum Referenzstamm (T10GP) stark reduziert ist.

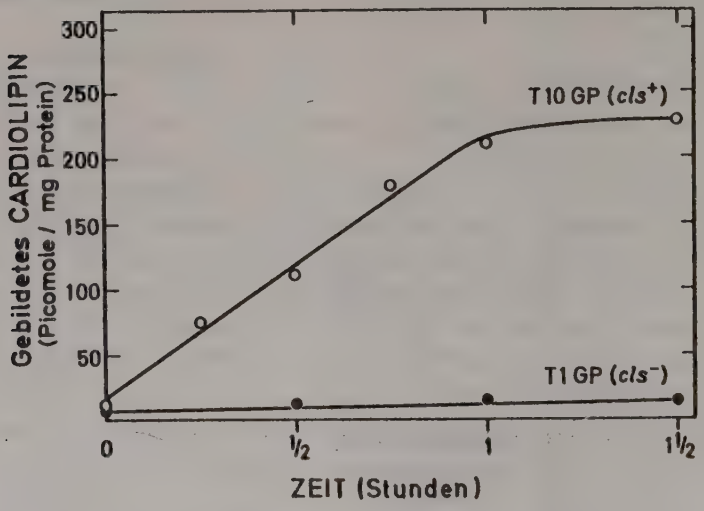


Abb. 8: Zellfreie Synthese von Cardiolipin. Es ist der zeitliche Verlauf der Bildung von ^{32}P-markiertem CL aus ^{32}P-PG gezeigt (experimentelle Einzelheiten siehe Diplomarbeit (105)).

3.1.2.2. Umsatz der anionischen Phospholipide

Die Hauptlipidkomponente der E.coli-Membran, PE, ist metabolisch relativ stabil, während PG und CL von wachsenden Zellen weiter umgesetzt werden. Zumindest ein Teil des Umsatzes von PG ist auf seine Umwandlung in CL zurückzuführen.
Noch weitgehend unverstanden ist die Enzymologie des Polyglycerophosphatid-Umsatzes (109). Er kann ohne negative Auswirkungen auf Zellwachstum und -teilung weitgehend inhibiert werden (120). Van Golde et al. (148) haben kürzlich eine Klasse wasserlöslicher Oligosaccharide des periplasmatischen Raumes beschrieben, deren Glycerophosphatsubstituenten primär von PG und/oder CL stammen. Mutationen, die die Synthese der Oligosaccharide inhibieren, führen gleichzeitig zu einer starken Reduktion des Polyglycerophosphatid-Umsatzes (120). Auch die Diglyceridgruppe des Murein-Lipoproteins (13) scheint primär von einem relativ langlebigen Lipidintermediat herzurühren (120).
Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob der Defekt in der Cardiolipinsynthese Auswirkungen auf den Polyglycerophosphatid-Umsatz hat.

Zu 10 ml exponentiell in Medium 4 bei 37°C wachsenden Kulturen von T15GP (cls$^+$) und T16GP (cls$^-$) wurden 100 µCi $^{32}P_i$ gegeben. Nach 5 Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert, gewaschen und bei einer Zelldichte von 7×10^7 Zellen/ml in Medium 4 (ohne $^{32}P_i$) resuspendiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben von 10 ml entnommen und die Zellen nach Zugabe von nicht markierten Trägerzellen abzentrifugiert. Die Phospholipide wurden wie unter 2.8.5. beschrieben, quantifiziert.
In Abb. 9 ist gezeigt, wie sich der Gehalt an radioaktiven Lipiden nach Entfernung des $^{32}P_i$ aus dem Medium veränderte.

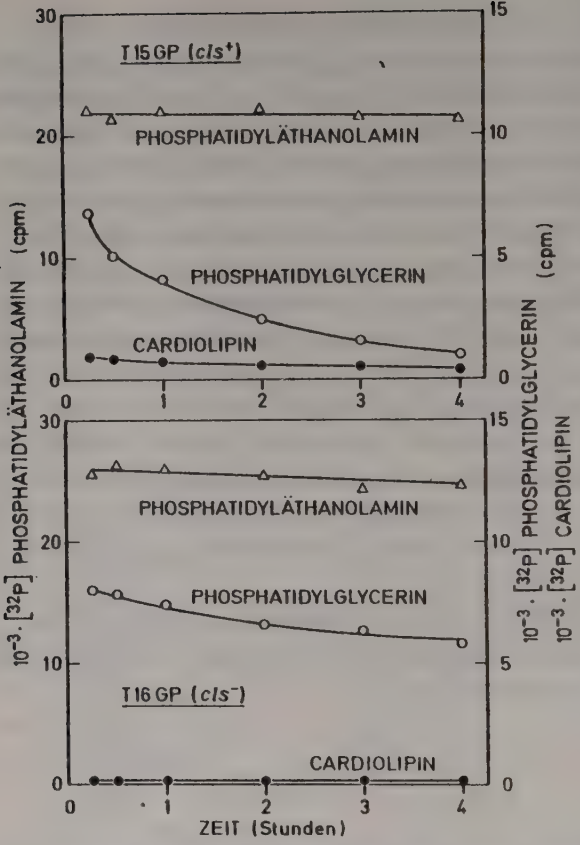


Abb. 9: Umsatz der Phospholipide

Bei beiden Stämmen ist PE metabolisch weitgehend stabil. Die Menge an radioaktiv markiertem PG nimmt bei Stamm T15GP exponentiell mit einer Halbwertszeit von ca. 90 Minuten ab. Da die Menge an markiertem CL ebenfalls abnimmt, reduziert sich die in den Membranen insgesamt enthaltene Menge an radioaktiv markiertem Lipid.

Bei Stamm T16GP ist PG metabolisch weitaus stabiler (Halbwertszeit etwa 8 Stunden) als in dem Vergleichsstamm mit intakter Cardiolipinsynthese. Dies läßt vermuten, daß zumindest der größte Teil des Polyglycerophosphatid-Umsatzes über CL verläuft.

Denkbar ist, daß von CL abgeleitete Phosphatidylglycerinphosphat-Reste als hydrophobe Träger bei Synthese und Transport der Oligosaccharide des periplasmatischen Raums dienen. Bei der Übertragung der Substituenten sollte Diglycerid frei werden, von dem auch größere Mengen nur bei intakter Oligosaccharidsynthese entstehen (110).
PG scheint der Donor für die terminale Diglyceridgruppe des Murein-Lipoproteins zu sein (28). Chattopadhyay und Wu (29) haben kürzlich gezeigt, daß der Einbau von ^{3}H-Glycerin in dieses Protein durch die cls-Mutation nicht inhibiert wird. Der relativ geringe PG-Umsatz in der cls-Mutante steht vermutlich in Zusammenhang mit dieser Transferreaktion.

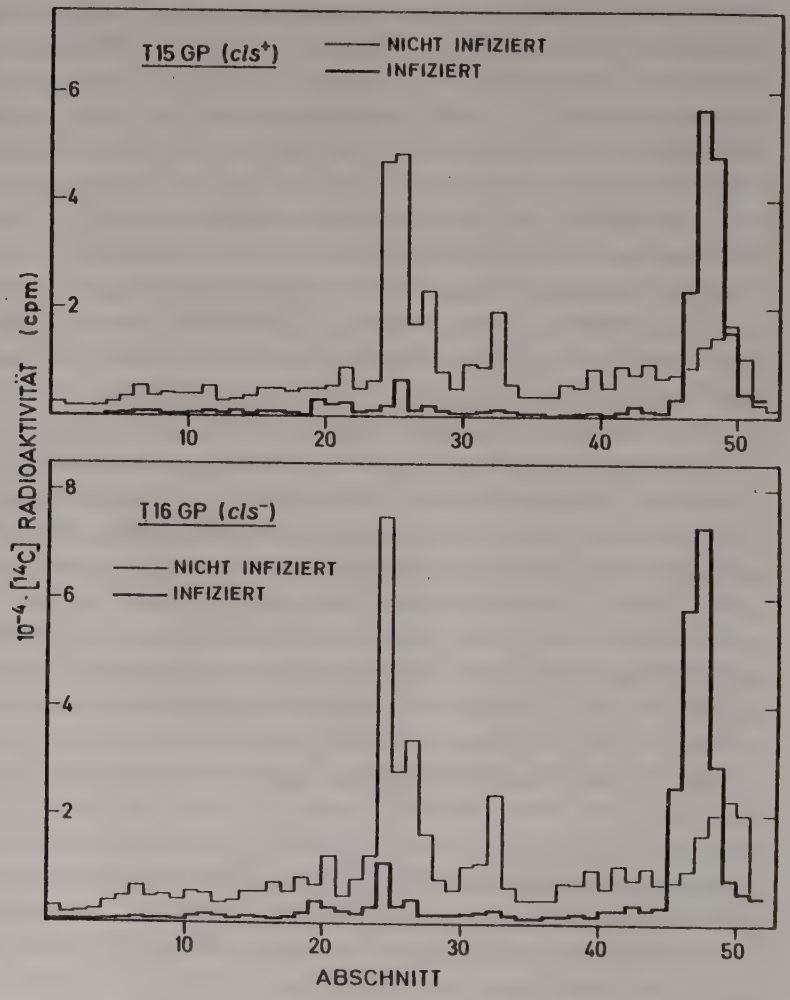
3.1.2.3. Einbau des Hüllproteins des Phagen M13 in die E.coli-Membran

E.coli-Zellen, die mit den F-spezifischen filamentösen Phagen f1 oder M13 infiziert werden, lysieren nicht, sondern setzen ihr Wachstum verlangsamt fort, wobei sie kontinuierlich einige 100 Phagen pro Generation ausschleusen (84). Die Verpackung der Virus-DNA in die Proteinhülle des Virus erfolgt in der cytoplasmatischen Membran der Wirtszelle. Das Haupthüllprotein der Viren (Gen 8-Produkt) wird vor der Phagenreifung in die bakterielle Membran integriert (134). Dieser Einbau wirkt sich auf den bakteriellen Phospholipidstoffwechsel aus. Es kommt zu einem Anstieg des relativen Gehalts an CL bei gleichzeitiger Abnahme des PG-Gehalts. Bei Infektionen mit Wildtyp-Phagen sind diese Veränderungen nur vorübergehend zu beobachten (154). Bei einer starken Akkumulation des Phagenhüllproteins in der bakteriellen Membran nach abortiver Infektion mit Phagen, die eine Mutation im Gen 1, 3, 4, 5, 6 oder 7 enthalten, kommt es dagegen zu drastischen und anhaltenden Verschiebungen der Lipidzusammensetzung (24) und in der Folge zum Absterben der Wirtszellen.
Da diese Veränderungen im Phospholipidstoffwechsel bei Infektionen mit amber-Mutanten im Phagengen 8, das für das Hüllprotein codiert, nicht auftreten, wurden sie mit der Akkumulation dieses Hüllproteins in direkten Zusammenhang gebracht. Chamberlain und Webster fanden eine Korrelation zwischen der Zunahme des Cardiolipingehalts und der Menge an eingebautem Hüllprotein (24). Sie vermuteten, daß eine spezifische Anlagerung von 5 - 10 Molekülen Cardiolipin notwendige Bedingung für den Einbau eines Hüllproteinmoleküls in die bakterielle Membran ist.
In meiner Diplomarbeit habe ich gezeigt, daß die Vermehrung von M13-Wildtyp-Phagen durch den Defekt in der Cardiolipinsynthese nicht beeinträchtigt wird. Die Ergebnisse von Chamberlain und Webster gaben Anlaß, den Einbau des Hüllproteins und die Veränderungen der Lipidzusammensetzung bei Stamm T15GP (cls$^+$) und T16GP (cls$^-$) nach Infektion mit M13-amber5-Mutanten (Genprodukt des defekten Gens ist

ein DNA-bindendes Protein) zu untersuchen.

Die Bakterien wurden in Medium 3 bei 37°C bis zu einer Zelldichte von 2 x 10^8 Zellen/ml angezogen. 10 ml dieser Kulturen wurden bei einer Multiplizität von 150 mit M13-amber5-H3-Phagen infiziert. 20 Minuten nach der Infektion wurden die Kulturen mit 5 µCi ^{14}C-Lysin versetzt und nach 3 Minuten rasch auf 0°C abgekühlt. Ein zweiter Teil der Kulturen blieb uninfiziert, wurde aber im übrigen der gleichen Behandlung unterworfen. Die Zellen wurden durch Beschallung aufgebrochen und rohe Membranfraktionen durch hochtourige Zentrifugation gewonnen (siehe 2.7.1.). Proben mit ungefähr 50 µg Membranprotein wurden im SDS-haltigen Probenpuffer aufgelöst und die Proteine elektrophoretisch mit einem 7 - 30 %-igen linearen Gradientengel aufgetrennt (2.7.4.).
Die Gele wurden mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt, einzelne Gelbahnen in 2 mm breite Streifen geschnitten und die enthaltene Radioaktivität wie unter 2.7.4.2. beschrieben, quantifiziert. Abb. 10 zeigt die so erhaltene Radioaktivitätsverteilung. Die nach Infektion der Bakterien stark markierte Bande am Ende der Gele entpricht dem Hüllprotein (Molekulargewicht 5240 (5)). Sie wurde durch Coomassie Blue gut angefärbt und lief parallel zum Hüllprotein von isolierten und direkt auf das Gel aufgetragenen M13-Phagen. Offensichtlich wird der Einbau des Hüllproteins in die bakterielle Membran von dem Defekt in der Cardiolipinsynthese nicht beeinflußt.
In einem Parallelexperiment wurden die Veränderungen der Phospholipidzusammensetzung der Membranen nach Infektion mit M13-amber5-Phagen untersucht. Hierzu wurden die Bakterien für einige Generationen in Medium 3 mit 1 µCi/ml $^{32}P_i$ angezogen. Bei einer Zelldichte von 2 x 10^8 Zellen/ml wurden die Kulturen wie im oben beschriebenen Experiment mit Phagen infiziert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben von je

Abb. 10: SDS-Polyacralamid-Gelelektrophorese der Membranproteine von Stamm T15GP und T16GP. Die Abbildungen zeigen die Radioaktivitätsverteilung auf den Gelen nach Markierung mit ^{14}C-Lysin ohne Infektion (dünne Linien) und nach Infektion (dicke Linien) mit M13-amber5-H3-Phagen.



5 ml entnommen und die Phospholipidzusammensetzung wie unter 2.8.5.2. beschrieben analysiert.

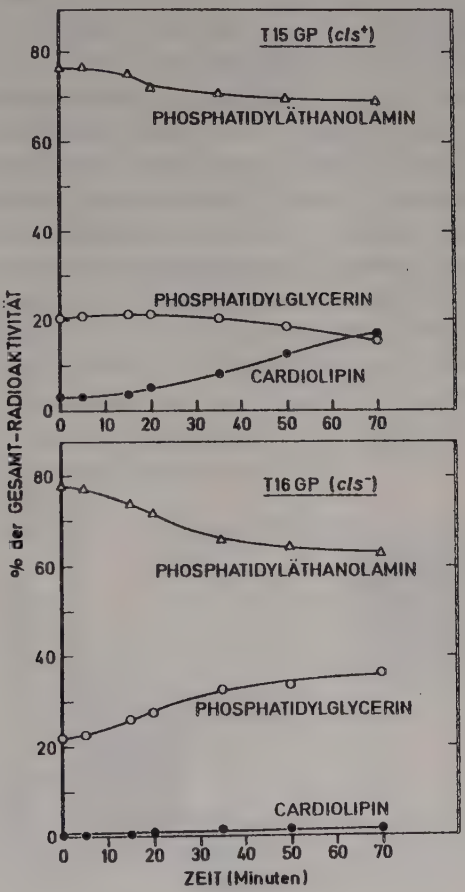


Abb. 11: Phospholipidzusammensetzung der Stämme T15GP und T16GP zu verschiedenen Zeiten nach Infektion mit M13-amber5-H3-Phagen.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Chamberlain und Webster führte die Infektion bei dem *cls*$^{+}$-Stamm T15GP zu einer Zunahme des relativen Gehalts an CL (Abb. 11 oben). Im Stamm T16GP (*cls*$^{-}$) blieb der CL-Gehalt klein. Dagegen stieg der Gehalt an PG von 21 auf 37 % (Abb. 11 unten). Synthese und Einbau des M13-Hüllproteins sind offenbar vom CL-Gehalt der bakteriellen Membran unabhängige Prozesse. Bei einer Akkumulation des Hüllproteins in der Cytoplasmamembran verändert sich jedoch die relative Syntheserate von anionischen zu zwitterionischen Phospholipiden. Dieser Effekt ist möglicherweise auf eine präferentielle Inhibition der PS-Synthase zurückzuführen (25).

3.2. Phasenumwandlungen der Membranlipide

Die cls-Mutation ermöglicht es, die Zusammensetzung der polaren Kopfgruppen der Membranlipide von E.coli-Zellen zu verändern. Stämme, die das defekte cls^--Allel enthalten, synthetisieren nur noch Spuren von Cardiolipin. Im Vergleich zu Wildtyp-Zellen ist dagegen die Konzentration an PG in den Membranen erhöht (3.1.2.1.).
Im folgenden sollte untersucht werden, wie sich diese Veränderungen auf das Phasenverhalten der Membranlipide auswirken.
Synthetische und biologische Phospholipide machen in wässriger Dispersion eine thermisch induzierte Phasenumwandlung zwischen einem geordneten (Gel-) und einem flüssig-kristallinen Zustand durch (74). Die verschiedenen Phasen lamellarer Lipidaggregate unterscheiden sich durch die innere Ordnung der Moleküle (Konformation) und durch die laterale Ordnung in der Membranebene (siehe Abb. 12).

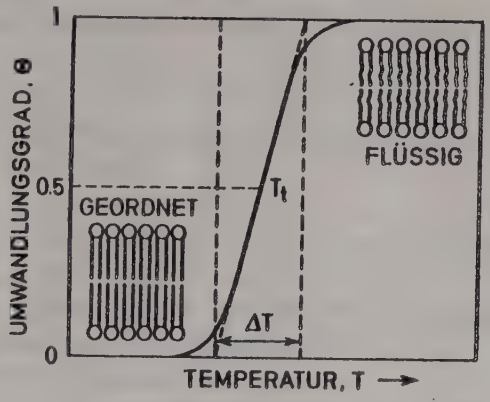


Abb. 12: Schematische Darstellung einer Lipidphasenumwandlung. Der Umwandlungsgrad Θ gibt das Verhältnis von in geordneter und ungeordneter Phase vorliegenden Lipidmolekülen an. T_t ist definiert als die Temperatur, für die gilt: Θ = 0,5 (50 % Umwandlung).

In der Gelphase unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur liegen gesättigte Acylreste gestreckt in der all-trans-Konformation vor und bilden ein zweidimensionales Gitter mit weitreichend hoher lateraler Ordnung. Dagegen sind rasche Konformationsänderungen der Fettsäureketten und hohe laterale Beweglichkeit der Lipidmoleküle kennzeichnend für die flüssig-kristalline Phase. Die Fettsäureketten enthalten oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur gauche-Konformationen, die zu einer lateralen Expansion des zweidimensionalen Gitters führen. Im Umwandlungsbereich liegen in der Membranebene geordnete neben ungeordneten Bereichen vor.

In Tabelle 5 sind Phasenumwandlungstemperaturen einiger synthetischer Glycerophosphatide aufgeführt. Vergleichswerte für synthetisches Cardiolipin sind bisher nicht veröffentlicht worden.

	Phasenumwandlungstemperatur T_t (°C)			
Fettsäurezusammensetzung / Lipid	12:0/12:0	14:0/14:0	16:0/16:0	cis18:1/cis18:1
PC	0[a]	23[a,b,c]	41[c]	-22[c]
PG	-5[e]	22[b]	42[b]	
PE	29[a]	47,5[a]	60[a]	
PS		40[b]	55[d]	

Tabelle 5 : Phasenumwandlungstemperaturen synthetischer Phospholipide (a: van Dijck et al. (146); b: van Dijck et al. (147); c: Ladbrooke et al. (72); d: MacDonald et al. (79); e: Verkleij et al. (149))

Aus der Tabelle läßt sich entnehmen, daß die Umwandlungstemperatur T_t eines Phospholipids von der Größe und Ladung seiner polaren Kopfgruppe und der Art der lipidgebundenen Fettsäuren abhängt. Durch Einführung von Doppelbindungen in die Kohlenwasserstoffketten der Fettsäuren oder durch

Reduktion der Kettenlänge läßt sich die Phasenumwandlungstemperatur herabsetzen.

Wildtyp-E.coli-Zellen enthalten etwa gleiche Mengen von gesättigten und einfach cis-ungesättigten Fettsäuren. Ihre Lipide weisen aufgrund der Heterogenität der Fettsäurezusammensetzung breite Phasenumwandlungen auf. Da diese experimentell nur schwer zu erfassen sind, wurden im folgenden Mutanten mit Defekten im Fettsäureabbau (fadE) und in der Synthese ungesättigter Fettsäuren (fabB) verwendet, deren Fettsäurezusammensetzung vom umgebenden Medium her kontrolliert werden kann (21, 98). Dem Medium zugegebene trans-Monoensäuren wie Elaidinsäure (trans-Δ^9-18:1) oder Palmitelaidinsäure (trans-Δ^9-16:1) können so bis zu 85 % der Fettsäuresubstituenten der Membranlipide ausmachen. Aufgrund der relativ einheitlichen Fettsäurezusammensetzung weisen diese Lipide relativ scharfe Phasenumwandlungen auf, die mit zahlreichen physikalischen Meßtechniken gut untersucht werden können (siehe 2.8.10.).
Für die folgenden Untersuchungen mußte zuerst die cls-Mutation in einen Stamm mit Defekt in Fettsäuresynthese und -abbau eingeführt werden.

3.2.1. Kombination der cls-Mutation mit Defekten in Fettsäuresynthese und -abbau

Als Ausgangsstamm diente die bereits in zahlreichen Studien (98) verwendete K12Ymel-Mutante K1062. Dieser Stamm hat einen Defekt in der Synthese ungesättigter Fettsäuren (fabB; β-Ketoacyl-ACP-Synthetase-I). Die Zellen können nur noch gesättigte Fettsäuren synthetisieren und benötigen zum Wachstum ein geeignetes Fettsäure-Supplement. Durch eine weitere Mutation (fadE;elektronenübertragendes Flavoprotein des Fettsäureabbaus durch β-Oxidation) ist sichergestellt, daß die Zellen exogene Fettsäuren nicht abbauen, sondern unverändert in die Membranlipide inkorporieren.
In den Stamm K1062 wurde zunächst durch Nitrit-Mutagenese eine Auxotrophie für Tryptophan eingeführt (2.6.6.).

Durch Transduktion mit Stamm T1GP (*trp*$^+$, *cls*$^-$) als P1-Donor wurden aus dem so gewonnenen Stamm T51GP (*fabB*, *fadE*, *trp*) die Rekombinanten T2GP (*fabB*, *fadE*, *cls*) und T20GP (*fabB*, *fadE*) isoliert. T2GP und der Kontrollstamm T20GP sind daher bis auf das *cls*-Gen isogen.

3.2.2. Phasenverhalten der isolierten Membranlipidkomponenten

Anders als bei den Fettsäureketten weiß man erst wenig über den Einfluß der polaren Kopfgruppen auf die physikalischen Eigenschaften der Membranlipide von *E.coli*. Im folgenden wurden daher zunächst die Eigenschaften der isolierten Lipidkomponenten der *E.coli*-Membranen untersucht.

Zellen des Stammes T20GP wurden in Medium 7 mit Palmitelaidinsäure als Supplement bei 40°C bis zur Stationärphase angezogen. Die Lipide wurden extrahiert und wie unter 2.8.2. beschrieben, säulenchromatographisch aufgetrennt. Die isolierten Komponenten waren auf Dünnschichtchromatogrammen einheitlich (siehe Abb. 13).

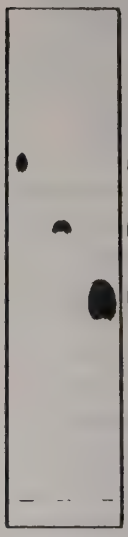


Abb. 13: Dünnschichtchromatogramm der isolierten Lipidkomponenten (Laufmittel1; 2.8.3.1.)

Das extrahierte Gesamtlipid bestand zu 76 % aus PE, 2 % aus PG und zu 22 % aus CL (Mol% P). In Tabelle 6 ist die Fettsäurezusammensetzung der isolierten Komponenten angegeben. PE weist einen um wenige % höheren Gehalt an Palmitelaidinsäure auf, als die anionischen Lipide.
Zur Bestimmung der Umwandlungstemperatur der Lipide dienten Lichtstreuungsmessungen. Vor der Messung wurden die Lipide wie unter 2.8.10. beschrieben, durch Ultraschallbehandlung im Puffer 2 dispergiert. Suspensionen von PE waren nicht stabil. Einige Zeit nach der Beschallung flockten größere

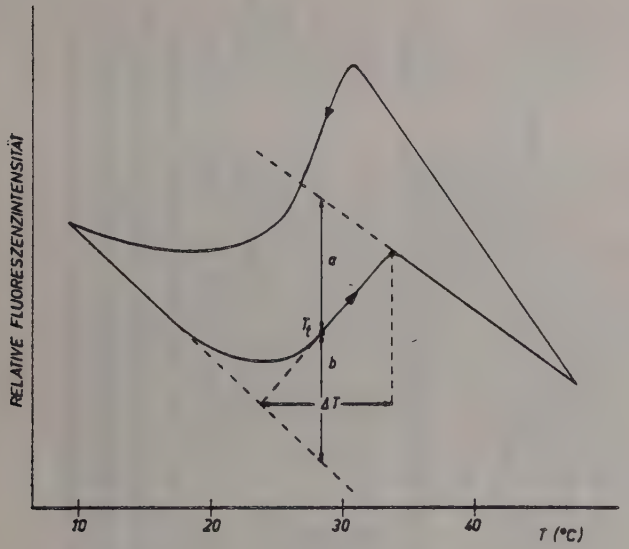


Abb. 14: PhNap-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur als Indikator für die Phasenumwandlung der Lipide: Zellen des Stammes T20GP mit Palmitelaidat als Supplement (2.8.10.1.A.)

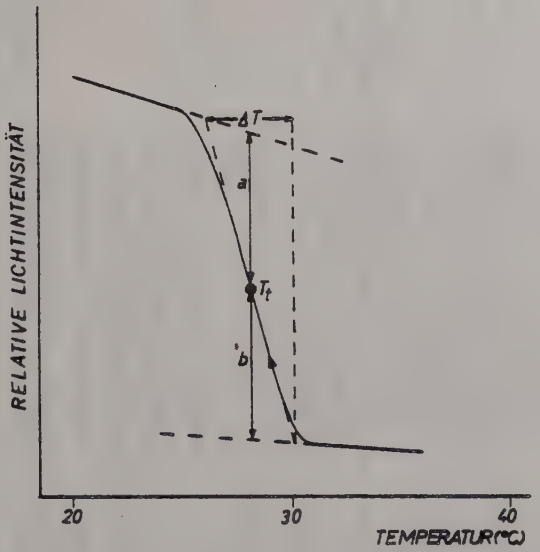


Abb. 15: 90°-Lichtstreuung von Phospholipiddispersionen in Abhängigkeit von der Temperatur: PE des Stammes T20GP mit Palmitelaidat als Supplement (2.8.10.2.)

Pfeile zeigen an, ob die Messungen bei zunehmender oder abnehmender Temperatur durchgeführt wurden. Normalisierte Kurven werden durch Auftragung von a/b gegen die Temperatur gewonnen. Für T_t gilt: a=b.

Lipidaggregate aus. Phasenumwandlungskurven bei aufsteigender oder absteigender Temperatur wurden daher bei diesem Lipid direkt nach der Beschallung aufgenommen. Die Tendenz von PE-Suspensionen, auszuflocken und größere Aggregate zu bilden, ist bereits zuvor beschrieben worden (102). Bei PG setzte die Phasenumwandlung erst bei ca. 8°C ein. Es war daher nicht möglich, vollständige Phasenumwandlungskurven von diesem Lipid aufzunehmen. Seine Phasenumwandlungstemperatur liegt wahrscheinlich nur wenig über 0°C.

Tabelle 6 : Fettsäurezusammensetzung der isolierten Lipidkomponenten

	CL	PG	PE	Gesamtlipid
12:0	1	1	1	1
14:0	4	2	4	3
16:0	23	25	19	20
18:0	1	2	1	1
trans-16:1	71	70	75	75

Tabelle 7 : Phasenumwandlungstemperaturen der Lipidkomponenten

Meßmethode: Lipidvesikel in Puffer 2: 90°-Lichtstreuung; Zellen: PhNap-Fluoreszenz.
Zur Auswertung der gemessenen Umwandlungskurven siehe Abb. 14 und Abb. 15.

	T_t (°C)	
	aufsteigend	absteigend
Zellen	28,5	27,5
Gesamtlipidextrakt	29,5	28,5
CL	28,5	26,5
PE	30	28
20 % CL / 80 % PE	28,5	27,5
20 % PG / 80 % PE	23,5	21,5

Bei einer Reihe von Untersuchungen ist gezeigt worden, daß die Kopfgruppen der PE-Moleküle über Wasserstoffbrücken stark miteinander wechselwirken (155). Solche intermolekularen Anziehungskräfte erhöhen die Phasenumwandlungstemperatur eines Lipids. Aus der Abstoßung zwischen den geladenen Kopfgruppen eines anionischen Lipids ergeben sich andererseits fluidisierende Wirkungen. Dies erklärt, warum die Phasenumwandlungstemperatur von PG um ca. 20 - 30°C tiefer liegt als die von PE (siehe auch Tabelle 5).
Die Phasenumwandlungstemperatur von CL, dem zweiten anionischen Phospholipid von E.coli liegt trotz negativer Ladung nahe bei der von PE. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß bei CL vier und nicht wie bei den übrigen Glycerophosphatiden nur zwei Fettsäuren an eine polare Kopfgruppe gekoppelt sind. Durch diese Verbrückung reduziert sich für die Fettsäureketten die Zahl der erlaubten Konformationen und Bewegungsmöglichkeiten.

In verschiedenen Untersuchungen sind nicht-lamellare Phasen von CL und PE nachgewiesen worden. Durch Röntgenbeugungsexperimente sollte daher im folgenden überprüft werden, ob bei den hier beobachteten Phasenübergängen der isolierten E.coli-Lipide neben Lipiddoppelschichten auch nicht-lamellare Strukturen beteiligt sind.

3.2.2.1. Röntgenbeugungsuntersuchungen

Strukturparameter von Lipidaggregaten können mit Hilfe der Röntgenbeugung direkt bestimmt werden (87, 128). Monochromatische Röntgenstrahlen werden dabei an einer Probe gestreut und die Intensität der Streustrahlung in Abhängigkeit vom Streuwinkel gemessen. Eine Analyse der Reflexe bei kleinen Steuwinkeln erlaubt es, die Struktur der Aggregate über weite Abstände (Symmetrie und Gitterkonstanten) zu spezifizieren. Reflexe im Bereich größerer Streuwinkel liefern Informationen über die Konformation und laterale Ordnung der Kohlenwasserstoffketten der Lipide.
Von den verschiedenen, nach den formalen Kriterien der

Kristallographie klassifizierten Strukturen (siehe Luzzati (78)) sind für Phospholipid-Wasser-Systeme vor allem eindimensionale lamellare Gitter (L-Phasen) und zweidimensionale hexagonale Gitter (H-Phasen) von Bedeutung (siehe Abb. 16).

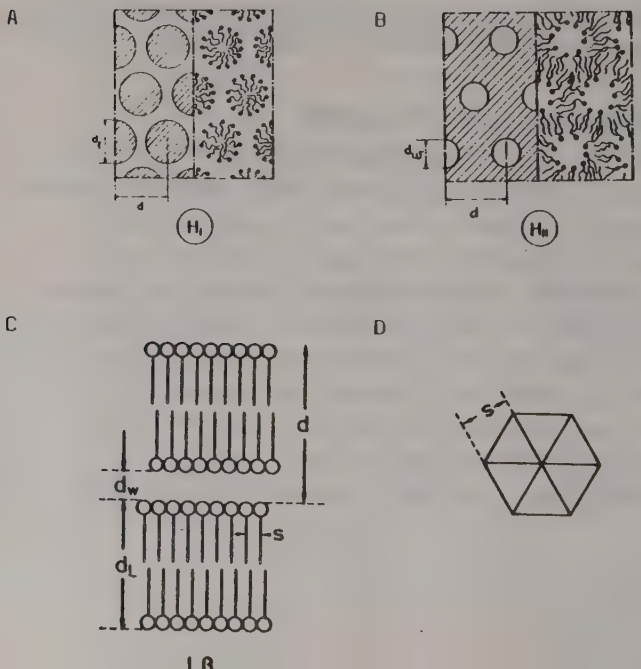
Abb. 16: Schematische Darstellung der Struktur von Lipid-Wasser-Systemen.

A) Hexagonal I ("Öl in Wasser")

B) Hexagonal II ("Wasser in Öl")

C) Lamellar; bei Röntgenbeugungsexperimenten wird der lamellare Abstand **d** gemessen, der sich aus der Dicke der Wasserschicht d_w und der Lipiddoppelschicht d_L zusammensetzt.

D) Hexagonales laterales Gitter der Fettsäuren in einer Lipid-Doppelschicht (Gelphase). Aus den Streuwinkeln der lateralen Röntgenreflexe läßt sich der Abstand s zwischen den Kohlenwasserstoffketten in der Ebene senkrecht zu den Kettenachsen ermitteln.



Hexagonale (H_{II})-Phasen, bei denen wässrige Zylinder mit hexagonaler Symmetrie in eine Matrix von Kohlenwasserstoffketten eingebettet sind, wurden u.a. auch bei CL und PE beobachtet.
PE geht beim Erwärmen auf Temperaturen oberhalb der Umwandlung von der geordneten in die flüssig-kristalline lamellare Phase in eine H_{II}-Phase über (32, 128). Bei PE aus Wildtyp-E.coli-Zellen erfolgt diese Umwandlung zwischen 55 und 60°C (32), weit oberhalb der Umwandlungstemperatur von der geordneten in die flüssig-kristalline Phase (69). PE aus Elaidinsäure-(trans-18:1)-supplementierten Zellen des Stammes T2GP (Fettsäurezusammensetzung: 85 % Elaidinsäure, 15 % gesättigte Fettsäuren) bildet in wässriger Suspension bis zu einer Temperatur von 80°C Doppelschichten aus (H.U. Gally et al.; unveröffentlichte Ergebnisse). Di-Elaidoyl-PE macht dagegen zwischen 45 und 60°C eine breite Umwandlung zwischen einer lamellaren und einer H_{II}-Struktur durch. Lipidgebundene gesättigte Fettsäuren scheinen folglich die Doppelschicht-Struktur zu stabilisieren.
Von Cardiolipin sind H_{II}-Phasen bei niederem Wassergehalt (<14 %) und in Anwesenheit von Calciumionen beobachtet worden (34, 113).
Zahlreiche Untersuchungen weisen darauf hin, daß Lipide in biologischen Membranen molekulare Doppelschichten ausbilden (74). Ob nicht-lamellare Lipidstrukturen bei bestimmten Membranprozessen eine Rolle spielen (33, 39, 135), ist umstritten.

Röntgenbeugung an PE und CL aus E.coli

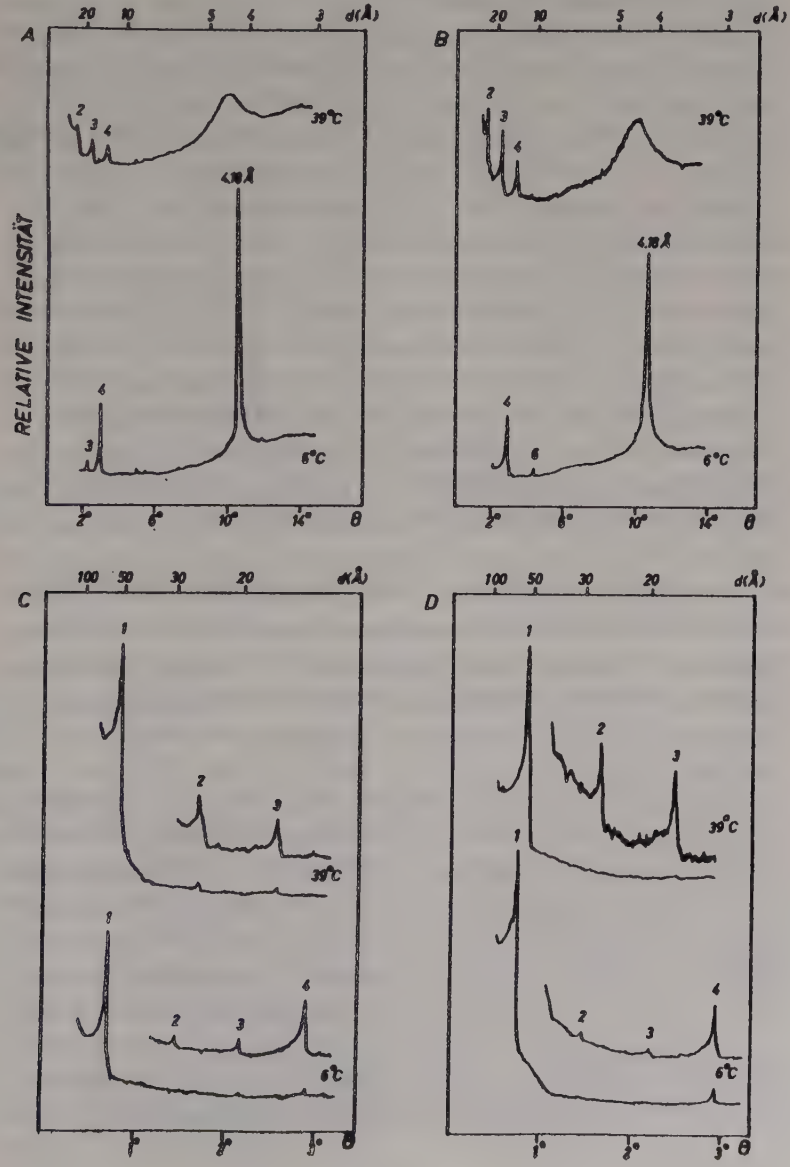
Untersucht wurde die Struktur von PE und CL in wässriger Dispersion bei Temperaturen oberhalb und unterhalb der Lipidphasenumwandlung (siehe auch Tabelle 7).
Das isolierte PE wurde mehrere Stunden bei 50°C mit überschüssigem Wasser (60 Gew.%) inkubiert. PE nimmt relativ wenig Wasser auf (46, 52, 70). Bei einem Wassergehalt von mehr als ca. 20 % scheidet sich neben dem hydratisierten Lipid eine reine Wasserphase ab (128). Anionische Lipide haben eine weitaus höhere Hydratationskapazität als zwitter-

ionische. Sie können große Wassermengen zwischen den Lamellen einlagern. Lamellare Bragg-Reflexe höherer Ordnung lassen sich jedoch unter diesen Bedingungen experimentell kaum mehr nachweisen. Um die Wasseraufnahme zu begrenzen, wurde das getrocknete CL nicht in Wasser suspendiert, sondern mehrere Stunden bei 50°C in einem abgeschlossenen Gefäß über destilliertem Wasser inkubiert. Die Wasseraufnahme (21,5 Gew.%) wurde später durch Auswiegen ermittelt. Jendrasiak et al. (70) fanden einen vergleichbaren Wassergehalt bei vollständig hydratisiertem CL.

Die Röntgenbeugungsreflexe wurden mit einer Guinier-Kamera aufgenommen. In der Abb. 17 sind Densitogramme der belichteten Röntgenfilme wiedergegeben (siehe auch 2.8.11.). Welche Gittersymmetrie die Lipidaggregate aufweisen, läßt sich aus den Abständen zwischen den Reflexen bei kleinen Streuwinkeln ermitteln. Bei beiden untersuchten Lipiden ist eine für lamellare Phasen charakteristische Sequenz zu beobachten (Werte für d mit steigendem n: 1; 1/2; 1/3 ...). Es gibt keinen Hinweis für das Vorliegen einer hexagonalen Struktur, bei der man folgende Sequenz beobachten würde: 1; $1/\sqrt{3}$; $1/\sqrt{4}$... (78).

Dispersionen lamellar organisierter Lipide setzen sich aus statistisch nach allen Richtungen orientierten Stapeln paralleler und äquidistanter Doppelschichten zusammen, die durch dünne Wasserschichten voneinander getrennt sind. Es liegt keine dreidimensionale Kristallstruktur vor, sondern nur eine eindimensionale Ordnung in der Richtung senkrecht zu den Membranoberflächen. Innerhalb jeder Membran können die Kohlenwasserstoffketten zusätzlich eine hohe zweidimensionale Ordnung aufweisen. Die zweidimensionalen lateralen Gitter aufeinanderfolgender Doppelschichten sind jedoch nicht miteinander gekoppelt. Die Beugungsmuster der Röntgenstrahlen kann man in direkter Analogie zur Frauenhofer-Beugung an optischen Gittern interpretieren. Jede Doppelschicht entspricht einem einzelnen Spalt des Gitters. Die Bedingung für eine konstruktive Interferenz der Röntgenstrahlen ergibt sich aus der Bragg-Beziehung

Abb. 17: Temperaturabhängigkeit der Röntgenbeugungsreflexe von PE (A, C) und CL (B, D) aus E.coli (Stamm T20GP mit Palmitelaidat als Supplement). In A und B sind die lateralen Beugunsreflexe und lamellare Reflexe höherer Ordnung gezeigt, in C und D die lamellaren Reflexe bei stärkerer Spreizung der Skala. Die Intensitätsmaxima sind mit den zugehörigen Werten für n markiert.



($2\,d \sin\theta = n\lambda$). Der lamellare Wiederholungsabstand d setzt sich aus der Dicke der Lipiddoppelschicht und der Wasserschicht zusammen (siehe Abb. 16), n ist eine ganze Zahl und θ der Winkel zwischen Membranebene und dem einfallenden Röntgenstrahl mit der Wellenlänge λ.
Die untersuchten Lipide weisen nahezu identische Werte für $d_{n=1}$ auf (siehe Abb. 17C, D). Bei beiden ist neben den lamellaren Reflexen bei kleinen Streuwinkeln bei 6°C noch ein einzelner scharfer Bragg-Reflex bei größerem Winkel zu beobachten. Dies zeigt, daß die Fettsäureketten bei dieser Temperatur lateral geordnet in einem hexagonalen Gitter mit einer Gitterkonstante von 4,18 Å vorliegen (siehe Abb. 16 D). Nach Erhöhung der Temperatur auf 39°C ist der einzelne laterale Reflex verschwunden. Dafür ist eine diffuse Bande bei ca. 4,5 Å zu beobachten. Dies ist ein direkter Nachweis dafür, daß die Kohlenwasserstoffketten von dem geordneten in den flüssig-kristallinen Zustand übergegangen sind.
Die laterale Expansion beim Phasenübergang führt wie zu erwarten, zu einer Reduktion des lamellaren Abstands ($d_{n=1}$), aber zu keiner Änderung der Gittersymmetrie.

3.2.3. Temperaturabhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit

Unter physiologischen Bedingungen liegen die Lipide biologischer Membranen im allgemeinen im flüssig-kristallinen Zustand vor (98). Extensive Untersuchungen mit E.coli-Mutanten der Fettsäuresynthese zeigten, daß es mit dem Wachstum der Zellen vereinbar ist, wenn ein Teil der Membranlipide in die Gelphase übergeht (69, 139, 144). Geordnete Lipiddomänen sind jedoch zur Aufrechterhaltung der Membranfunktionen nicht notwendig (98). Mutanten mit temperatursensitiven Enzymen der Synthese ungesättigter Fettsäuren können bei 36°C noch mit ca. 16 % und bei 45°C mit nur noch 9 % ungesättigten (cis-Monoen-) Fettsäuren wachsen (1, 14, 69, 144). Unter diesen Bedingungen koexistieren in den Membranen der kontinuierlich wachsenden Zellen flüssig-kristalline und geordnete Lipid-Domänen. Gehen mehr als etwa 50 % der Lipide in die Gelphase über, so

sterben diese Zellen ab (69).
Mutanten, die keine ungesättigten Fettsäuren mehr synthetisieren können, benötigen zum Wachstum ein Supplement von Fettsäuren, durch deren Inkorporation die Umwandlungstemperatur der Lipide unter die Wachstumstemperatur herabgesetzt wird. Eine Vielzahl verschiedener langkettiger Monocarbonsäuren mit sterischen Störungen in zentraler Position der Kohlenwasserstoffkette (Doppelbindungen, Kettenverzweigungen, Bromsubstituenten) können dabei die cis-Monoenfettsäuren der Wildtyp-Zellen ersetzten (21, 98).
Bei einer Supplementierung mit Palmitelaidat liegt die Phasenumwandlungstemperatur der Lipide im Bereich physiologischer Temperaturen. Die Lage der unteren limitierenden Wachstumstemperatur wird unter diesen Bedingungen von dem Phasenverhalten der Membranlipide bestimmt. Eine Kopfgruppeninduzierte Verschiebung der Phasenumwandlungstemperatur sollte sich daher auf das Wachstumsverhalten der Zellen auswirken. Mutanten, die das defekte $\underline{cls}^-$-Allel enthalten, synthetisieren nur Spuren von CL. Dagegen ist der Gehalt an PG gegenüber Kontrollstämmen mit Wildtyp-$\underline{cls}^+$-Allel erhöht. Da die Phasenumwandlungstemperatur von PG ca. 25°C tiefer liegt, als die von CL und PE (siehe 3.2.2.), solle die limitierende untere Wachstumstemperatur bei Supplementierung mit Palmitelaidat für Stamm T2GP ($\underline{cls}^-$) tiefer liegen als für den Kontrollstamm T2OGP ($\underline{cls}^+$). Diese Annahme wurde im folgenden Experiment überprüft.

Exponentiell bei 40°C in Medium 7 mit Palmitelaidat als Supplement wachsende Zellen der Stämme T2GP und T2OGP wurden bei verschiedenen Wachstumstemperaturen weiter inkubiert. Die Zunahme der optischen Dichte der Kulturen wurde verfolgt und die Generationszeit nach einer mehrstündigen Adaptationsphase ermittelt. In Abb. 18 sind die Wachstumsgeschwindigkeiten logarithmisch gegen die reziproke Temperatur aufgetragen.
Es zeigte sich, daß der Stamm T2GP bei Temperaturen unter 39°C einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Referenzstamm T2OGP hat.

Abb. 18: Temperaturabhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeiten

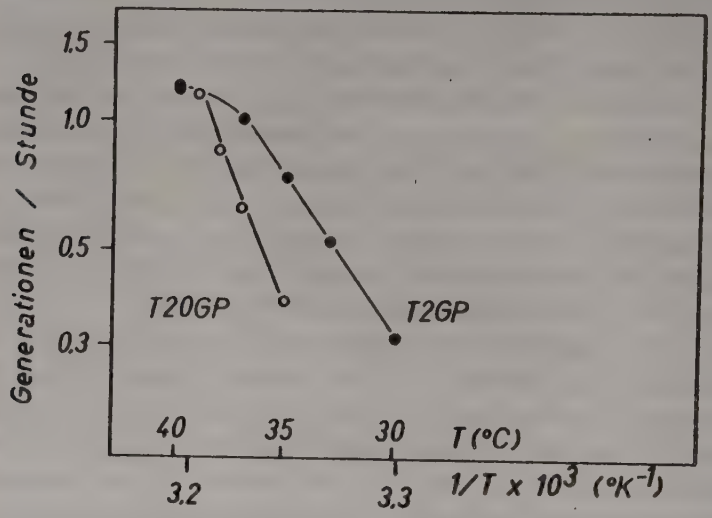


Tabelle 8: Phasenumwandlung der Lipide bei Supplementierung mit Palmitelaidat (PhNap-Fluoreszenz; 2.8.10.1.)

Stamm	T_t (°C)	Breite der Umwandlung (°C)	Wachstumstemp. (°C)
T2GP	23	14 - 31	30
T20GP	28	20 - 35	35

Aus Tabelle 8 läßt sich entnehmen, daß die Phasenumwandlungstemperatur der Lipide bei Stamm T2GP um etwa 5°C tiefer liegt als bei dem Referenzstamm. Bei beiden Stämmen korreliert die untere limitierende Wachstumstemperatur mit der oberen Grenze der Lipidphasenumwandlung. Die Lage der Phasenumwandlungstemperatur änderte sich nur geringfügig, wenn die Zellen bei höheren Temperaturen angezogen wurden.

Mit Oleat (cis-Δ^9-18:1) als Supplement wuchsen beide Stämme bei 28°C mit gleicher Generationszeit. Fettsäuren, die wie Ölsäure cis-Doppelbindungen enthalten, setzen die Phasenumwandlungstemperatur der Lipide stärker herab, als ihre trans-Isomere, die in ihren sterischen Eigenschaften den gesättigten Ketten stärker ähneln (98). Bei einer Supplemen-

tierung mit Oleat wurden daher tiefer liegende Umwandlungstemperaturen beobachtet (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9 : Phasenumwandlung der Lipide bei Supplementierung mit Oleat (PhNap-Fluoreszenz; 2.8.10.1.)

Stamm	T_t (°C)	Wachstumstemp. (°C)	Lipidzusammensetzung (Mol% P)		
			PE	PG	CL
T2GP	12	28	79	20	<1
T2OGP	16	28	76	8	16

Die Lage der unteren limitierenden Wachstumstemperatur bei Supplementierung mit Palmitelaidat wurde auch nach Vorinkubation der Zellen mit Oleat bestimmt. Die bei 28°C exponentiell in Medium 1 mit Oleat als Supplement wachsenden Zellen wurden gewaschen und bei verschiedenen Temperaturen im gleichen Medium mit Palmitelaidat weiter inkubiert. Zellen des Stammes T2GP stellten nach einigen Generationszeiten ihr Wachstum bei Temperaturen unter 30°C, Zellen des Stammes T2OGP bei Temperaturen unter 34°C ein.

Aufgrund der Kopfgruppen-induzierten Herabsetzung der Lipidphasenumwandlungstemperatur sollte die für ein Wachstum bei einer bestimmten Temperatur essentielle Menge an ungesättigten Fettsäuren für Stamm T2GP geringer sein als für den Kontrollstamm T2OGP. Im folgenden Experiment sollte dies überprüft werden.

3.2.4. Fettsäurehunger-Experimente

Exponentiell bei 40°C in Medium 7 mit Palmitelaidat als Supplement wachsende Zellen der Stämme T2GP und T2OGP wurden abzentrifugiert und zweimal mit Puffer 1 gewaschen. Alle Schritte wurden bei einer Temperatur von ca. 35°C durchgeführt. Die Zellen wurden in Medium 7 ohne Fettsäure-Supplement resuspendiert und bei 40°C weiter inkubiert. Zur Kontrolle wurden 5 Stunden nach dem Wechsel des Mediums von jeder Kultur 0,1 ml entnommen und auf Medium 1-Platten (ohne Fettsäure-Supplement) ausgestrichen. Die Reversionsrate der *fabB*-Mutation erwies sich als äußerst gering: auf den Platten waren auch nach viertägiger Inkubation bei 40°C keine Kolonien revertierter Zellen zu finden. Über einen Zeitraum von 5 Stunden wurden außerdem die Veränderungen von optischer Dichte und Lebendzellzahl in den Kulturen verfolgt. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden Proben in geeigneter Verdünnung auf Medium 5-Platten mit Ölsäure-Supplement bei 40°C ausplattiert und die aufwachsenden Kolonien gezählt. In Abb. 19 sind die Veränderungen der Lebendzellzahl nach Entfernung des Fettsäure-Supplementes aufgetragen. Während die Zellen des Stammes T2OGP nach ca. 1 Stunde rasch exponentiell absterben, sind bei Stamm T2GP nur relativ geringe Veränderungen zu beobachten.

In Abb. 20 sind die Veränderungen der optischen Dichte gezeigt. In der Kultur des Stammes T2GP nimmt die Zellmasse nach ca. 2 bis 3 Stunden nicht mehr weiter zu. Die Absorption der Kultur bleibt konstant. Dagegen sinkt die optische Dichte der Kultur des Stammes T2OGP nach 1 bis 2 Stunden langsam ab. Dies zeigt an, daß die Bakterienzellen lysieren.

Zu verschiedenen Zeiten nach Entfernung des Fettsäure-Supplements wurden aus den Kulturen Proben entnommen und die Phasenumwandlungstemperatur der Lipide in ganzen Zellen nach Zugabe von PhNap bestimmt (siehe unten). Aus einem Teil der geernteten Zellen wurden die Lipide extrahiert und die Zusammensetzung der lipidgebundenen Fettsäuren ermittelt. Beide untersuchten Stämme bauen nach Entfernung des Fett-

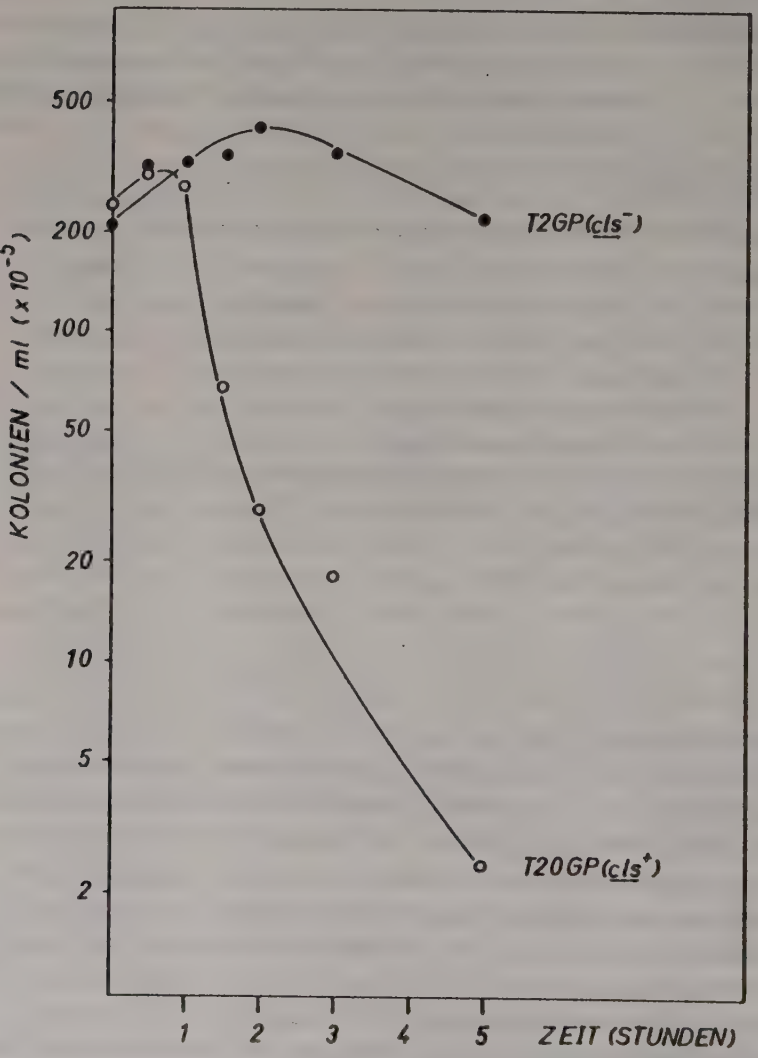
säure-Supplements gesättigte Fettsäuren mit ungewöhnlich geringer Kettenlänge ein (12:0, 14:0). Besonders bei Stamm T2GP führt dies nach längerer Inkubation zu einer starken Reduktion der mittleren Kettenlänge der lipidgebundenen Fettsäuren (Tabelle 10).

Tabelle 10: Zusammensetzung der lipidgebundenen Fettsäuren zu verschiedenen Zeiten nach Entfernung des Palmitelaidinsäure-Supplements (Angaben in Mol%). Entnahme der Proben siehe Abb. 20

Stamm	Probe	12:0	14:0	16:0	trans-Δ^9-16:1	mittlere Kettenlänge
T2OGP	1	3,5	10	17	69,5	15,65
	2	6,5	27,5	15,5	50,5	15,2
	3	14	37	18,5	30,5	14,7
	4	13	39	22	26	14,7
	5	12,5	40	25,5	22	14,7
	6	11,5	45	25,5	18	14,65
T2GP	1	4	8,5	12,5	75	15,5
	2	9	21	9,5	60,5	15,2
	3	12,5	33	9,5	45	14,85
	4	21,5	43,5	8,5	26,5	14,25
	5	27	46	8	19	14
	6	33	47,5	6	13,5	13,75

Eine präferentielle Synthese kurzkettiger Fettsäuren nach Entfernung des Fettsäure-Supplements wurde bereits zuvor beschrieben (1, 131, 139). Andererseits zeigten Cronan et al. (23), daß E.coli-Zellen mit Defekt in der biosynthetischen Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase bei spezifischer Inhibition der Phospholipidsynthese ungewöhnlich langkettige Fettsäuren synthetisieren (ungesättigte mit bis zu 20 und gesättigte mit bis zu 22 Kohlenstoffatomen). Die Autoren vermuten, daß die Kettenlänge der Acylgruppen nicht allein durch die Spezifität der β-Ketoacyl-ACP-Synthetase bestimmt wird. Eine zusätzliche Regulation ergibt sich wahrscheinlich

Abb. 19: Zahl der Kolonienbildner in Kulturen der Stämme T2GP und T20GP. Zum Zeitpunkt 0 wurden die Zellen im Fettsäurehungermedium resuspendiert.



aus einer Kompetition zwischen der Elongation der Fettsäuren und ihrer Inkorporation in die Phospholipide. Dies würde erklären, warum die Fettsäuren nach Blockierung des Acyltransfers auf Glycerinphosphat zusätzliche Elongationszyklen durchlaufen (23). Die hier beobachtete Verkürzung der Kettenlänge deutet daher auf einen ungewöhnlich raschen Einbau der neu synthetisierten Fettsäuren in die Phospholipide hin. Denkbar ist, daß beim Fehlen eines Fettsäure-Supplements die Fettsäuresynthese ein limitierender Faktor für die Phospholipidsynthese der fabB-Mutanten ist.

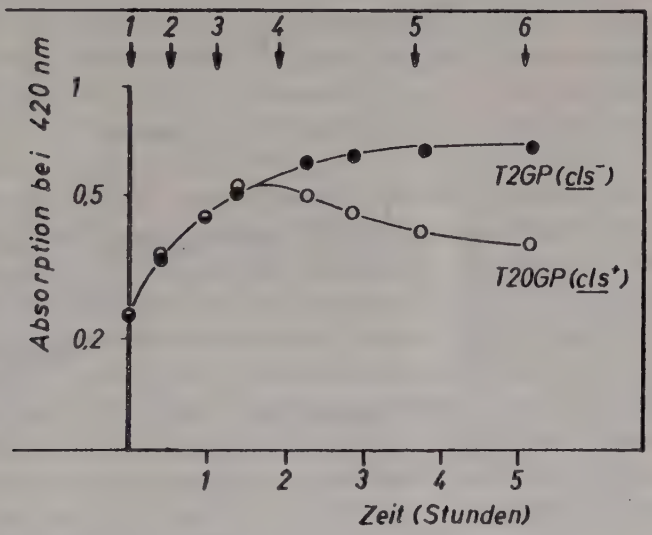


Abb. 20: Änderung der optischen Dichte von Kulturen der Stämme T2GP und T20GP nach Entfernung des Palmitelaidinsäuresupplementes (t = 0). Pfeile geben den Zeitpunkt für die Entnahme der Proben zur Bestimmung der Phasenumwandlungstemperatur und der Fettsäurezusammensetzung der Membranlipide an.

Um Aufschluß über die Kopfgruppenzusammensetzung der Lipide zu erhalten, wurden abschließend aus Parallelkulturen mit 10 µCi/ml $^{32}P_i$ in allen verwendeten Medien zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen, die Lipide extrahiert, dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (Laufmittel 1) und durch Auskratzen der Lipidflecke quantifiziert. Vor dem Wechsel zum Hungermedium waren die Zellen für mehrere Generationen in $^{32}P_i$-haltigem permissivem Medium angezogen worden. In Abb. 21 sind die Ergebnisse dieses Experiments gezeigt.

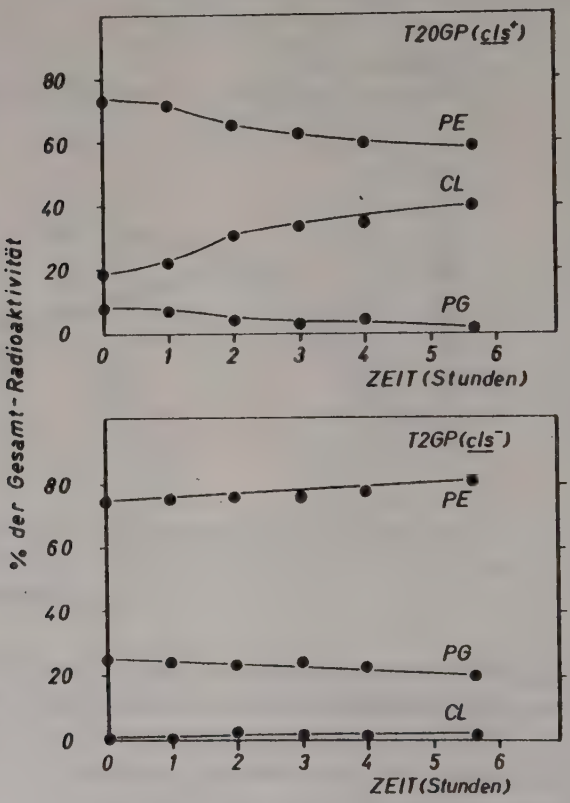


Abb. 21: Zusammensetzung der Phospholipide der Stämme T2GP und T20GP. Zum Zeitpunkt 0 wurden die Zellen im Fettsäurehungermedium resuspendiert.

Bei Stamm T2GP sind nach Entfernung des Fettsäure-Supplements nur geringfügige Veränderungen der Kopfgruppenzusammensetzung der Phospholipide zu beobachten. Dagegen kommt es bei Stamm T2OGP zu drastischen Veränderungen. Der prozentuale Gehalt an PE sinkt von 73 % auf 58 % ab. Der Cardiolipingehalt verdoppelt sich und erreicht 39 %. Zellen mit Wildtyp-*cls*$^+$-Allel enthalten generell nur bei sehr hohen Wachstumsraten mehr PG als Cardiolipin. Dies erklärt, warum das Verhältnis von PG zu Cardiolipin bei Stamm T2OGP bereits zum Zeitpunkt des Mediumswechsels relativ klein ist.

Die Veränderungen der Phospholipidzusammensetzung nach Fettsäurehunger (Abb. 21) und Akkumulation des M13-Hüllproteins (Abb. 11) bei Stämmen mit Wildtyp-*cls* -Allel zeigen auffallende Ähnlichkeiten. Dies läßt vermuten, daß die Akkumulation anionischer Lipide ein unspezifischer Effekt ist, der allgemein bei Störungen der Membranstruktur auftritt. Bei den Stämmen mit *cls*$^-$-Allel ist eine PG-Akkumulation nur beim Absterben der Zellen nach Infektion mit M13-amber-Phagen, nicht aber nach Einstellung des Wachstums ohne Zellyse im Fettsäurehunger-Medium zu beobachten. Von Bedeutung könnte in diesem Zusammenhang sein, daß die PS-Synthase im Gegensatz zu allen anderen Enzymen der Phospholipidsynthese von *E.coli* nicht fest an die Cytoplasmamembran gebunden ist (109). Vermutlich reagiert dieses Schrittmacherenzym der PE-Synthese (siehe Abb. 2) daher besonders sensitiv auf Veränderungen der Oberflächeneigenschaften der Membran. Weitere Untersuchungen könnten hier wichtige Einblicke in die Regulationsmechanismen der Lipidsynthese liefern.

In Abb. 22 sind die Phasenumwandlungstemperaturen der Membranlipide als Funktion des molaren Verhältnisses von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren aufgetragen. Pfeile in Abb. 20 zeigen an, zu welchen Zeiten die Proben entnommen worden waren.
In dem Medium ohne Fettsäure-Supplement können die *fabB*-Mutanten nur noch endogen synthetisierte gesättigte Fettsäuren in ihre Lipide inkorporieren. Dies führt zu einer Er-

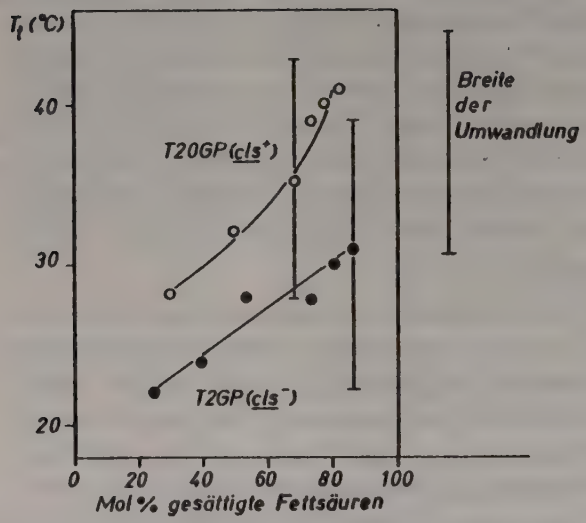


Abb. 22: Phasenumwandlungstemperatur der Lipide in Abhängigkeit von der Fettsäurezusammensetzung (PhNap-Fluoreszenz der Zellen (2.8.10.1.A.) bei aufsteigender Temperatur)

niedrigung des Verhältnisses von lipidgebundenen ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren und zu einem Ansteigen der Phasenumwandlungstemperatur der Membranlipide.
Bei Stamm T2GP ist dieser Anstieg allein auf die Veränderungen in der Fettsäurezusammensetzung zurückzuführen. Bei Probe 6 (13,5 % Palmitelaidinsäure) setzt die Phasenumwandlung bei etwa 39°C ein (siehe Abb. 22). Dies bedeutet, daß auch nach Einstellung des Wachstums sich noch alle Lipide in der fluiden Phase befinden. In einem Kontrollexperiment wurde die Wachstumstemperatur auf 44°C erhöht. Auch bei dieser Temperatur stellten die Zellen ihr Wachstum ein, bevor der Gehalt an Palmitelaidinsäure unter 10 % gesunken war.
Die Phasenumwandlungstemperatur der Lipide des Kontrollstammes T20GP (cls$^+$) liegt aufgrund des niedrigeren Gehalts an PG (siehe Abb. 21) bei vergleichbarer Fettsäurezusammensetzung um ca. 5°C höher als bei dem Stamm T2GP (cls$^-$). Auch bei Stamm T20GP steigt die Phasenumwandlungstemperatur bei Reduktion des Palmitelaidinsäuregehalts an. Geringe zu-

sätzliche Effekte ergeben sich vermutlich aus den Veränderungen in der Zusammensetzung der polaren Kopfgruppen (siehe Abb. 21). Das vorhandene PG wandelt sich nach einiger Zeit nahezu vollständig in CL um. Dies führt zu einem beschleunigten Ansteigen der Phasenumwandlungstemperatur (siehe Abb. 22). Das Verhältnis von CL zu PE spielt in diesem Zusammenhang vermutlich keine große Rolle, da beide Lipide bei vergleichbaren Temperaturen in die geordnete Phase übergehen (siehe Tabelle 7).
Bei Stamm T2OGP reicht der Umwandlungsbereich der Lipide bei Probe 3 von 28 bis 42°C. Bei der Wachstumstemperatur von 40°C liegen folglich bereits Teile der Lipide in der geordneten Phase vor. Die Lyse der Zellen setzt ungefähr zum Zeitpunkt der Entnahme dieser Probe ein (siehe Abb. 19). In der Folge erhöht sich die Lipidphasenumwandlungstemperatur noch weiter. In den Zellen der Probe 6 sind bereits mehr als 50 % der Lipide in die Gelphase übergegangen (T_t = 41°C). Mehrere Experimente zeigten, daß der Stamm T2OGP generell 5 - 10 % weniger exogene Fettsäuren in seine Lipide einbaut als der Stamm T2GP. Möglicherweise steht dies in Zusammenhang mit Unterschieden im Polyglycerophosphatid-Umsatz (siehe 3.1.2.2.).

Die unterschiedlichen Überlebensraten der Stämme T2GP und T2OGP im Fettsäurehunger-Medium (siehe Abb. 19) erklären sich vermutlich aus der Tatsache, daß sich nur bei Stamm T2OGP geordnete Lipiddomänenen ausgebildet haben.
Henning et al.(57) zeigten, daß Fettsäure-auxotrophe Zellen, die nur noch gesättigte Fettsäuren synthetisieren können, einige Zeit nach Entfernung des Fettsäure-Supplements ihre Makromolekül-Synthese stark reduzieren. Eine Zellyse tritt nur bei hinreichend schnellem Zellwachstum ein und läßt sich durch Zugabe von Inhibitoren der Proteinsynthese verhindern. Andere Autoren haben auf ein Ansteigen der passiven Permeabilität der Zellmembran kurz vor Beginn der Zellyse hingewiesen (50, 91, 97). An Modellsystemen wurde gezeigt, daß kleine hydrophile Moleküle schnell durch Lipiddoppelschichten diffundieren können, wenn geordnete und

fluide Domänen nebeneinander vorliegen (83, 101). Bei zahlreichen Untersuchungen konnten außerdem Zusammenhänge zwischen der biologischen Aktivität membrangebundener Proteine und dem physikalischen Zustand der Lipidphase aufgezeigt werden (98). In welchem Maße Zellen diese pleiotropen Effekte ausgleichen können, hängt vermutlich von zahlreichen Faktoren wie dem allgemeinen physiologischen Zustand der Zellen, der Heterogenität und Art der lipidgebundenen Fettsäuren (zusätzlich neben ihrem Einfluß auf die Phasenumwandlungstemperatur) und der Zusammensetzung des Kulturmediums ab. So können Mutanten mit temperatursensitiven Enzymen der Synthese ungesättigter Fettsäuren bei semipermissiven Temperaturen auch dann noch kontinuierlich wachsen, wenn ein Teil der Membranlipide in der Gelphase vorliegt (69, 144). Die Zellen enthalten unter diesen Bedingungen nur geringe Mengen an PG (20, 144) und bei 45°C nur noch 10 % cis-Monoensäuren (144).

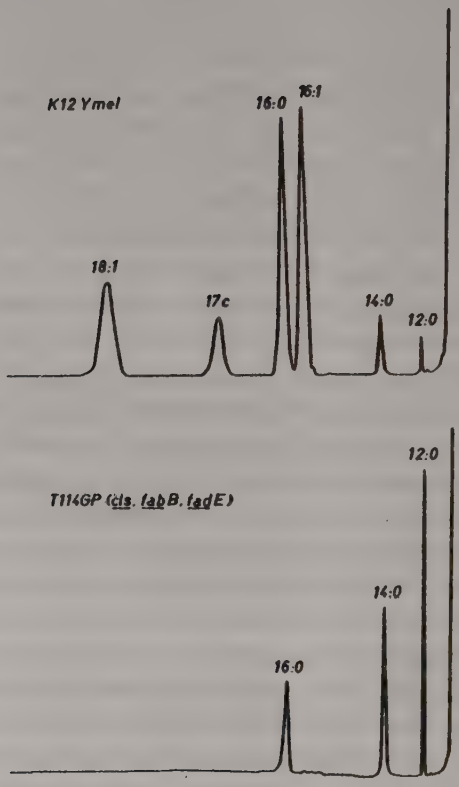
Durch Extrapolation erhält man aus Abb. 22 für Zellen des Stammes T2OGP, die nur noch gesättigte Fettsäuren enthalten, eine mittlere Lipidphasenumwandlungstemperatur von über 50°C. Bei Experimenten mit Ölsäure-supplementierten Zellen haben Thilo und Overath (139) einen ähnlichen Wert erhalten. Wie zu erwarten, liegt diese extrapolierte Phasenumwandlungstemperatur zwischen denen von Dimyristyroyl-(14:0/14:0)-PE (47,5°C) und Dipalmitoyl-(16:0/16:0)-PE (60°C) (siehe Tabelle 5). Bedingt durch den stärkeren Einbau von Laurinsäure (12:0) (siehe Tabelle 10) und den fluidisierenden Einfluß des Phosphatidylglycerins liefert die Extrapolation für Stamm T2GP einen weit niedrigeren Wert (33°C). Mit dem Phasenverhalten der Lipide läßt sich folglich nicht erklären, warum der Stamm T2GP ohne Supplementierung mit ungesättigten Fettsäuren nicht weiterwächst. Es ist vermutet worden, daß die speziellen Packungseigenschaften solcher Fettsäuren eine essentielle Rolle beim Ausgleich der Störungen spielen, die sich aus der Inkorporation integraler Membranproteine für die Lipidphase ergeben (68, 117). Um diese Erklärungsmöglichkeit ausschließen zu können,

wurde im folgenden versucht, ein kontinuierlich wachsendes Derivat des Stammes T2GP zu isolieren, dessen Lipide ausschließlich gesättigte Fettsäuren enthalten.

3.2.5. E.coli-Zellen, deren Lipide ausschließlich gesättigte Fettsäuren enthalten

Zellen des Stammes T2GP wurden auf Medium 6-Platten ausgestrichen und die mit äußerst niedriger Frequenz aufwachsenden Einzelkolonien näher untersucht. Neben Revertanten, die die Fähigkeit zur Synthese ungesättigter Fettsäuren rückgewonnen hatten, wurde ein ohne ungesättigte Fettsäuren kontinuierlich wachsender Stamm isoliert. In Kulturen dieses Stammes wurden Zellen mit differierenden Wachstumseigenschaften gefunden. Ein relativ schnell wachsender Clon, Stamm T114GP wurde näher chrakaterisiert.
Zellen dieses Stammes wachsen sowohl in Vollmedium (Medium 1 und 5) als auch in Minimalmedium (Medium 2 und 6). Gegenüber Wildtyp-E.coli-Zellen ist die Generationszeit erhöht (ca. 1 Stunde in Medium 1 bei 37°C).
Bei 37°C in Medium 5 wachsende Zellen wurden geerntet, die Lipide extrahiert und wie unter 2.8.2. beschrieben säulenchromatographisch aufgetrennt. Die Fettsäuren des isolierten Phosphatidyläthanolamins wurden zur eindeutigen Identifizierung massenspekrometrisch untersucht (GC/MS-Kopplung: siehe 2.8.8.3.; für die Durchführung dieser Analysen danke ich Herrn Prof. Stoffel, Institut für Physiologische Chemie, Köln). An Hand der charakteristischen Fragmentierungsmuster der Fettsäuremethylester wurden die in etwa gleichen Mengen vorliegenden drei Hauptkomponenten als Laurinsäure (12:0), Myristinsäure (14:0) und Palmitinsäure (16:0) identifiziert (siehe Abb. 23). Bei einer nur in Spuren enthaltenen vierten Komponente war das Verhältnis von Signal zu Rauschen für eine eindeutige Identifizierung zu ungünstig. Ein Signal bei M = 298 deutete auf den Methylester der Stearinsäure (18:0) hin (Molekülpeak). Kleine Mengen der identifizierten Fettsäuren lagen in der untersuchten Probe nicht als Methylester sondern in freier Form vor. Der Gehalt an ungesättig-

Abb. 23: Fettsäurezusammensetzung des Phosphatidyläthanolamins von Stamm K12Ymel (*E.coli*-Wildtyp) und Stamm T114GP. Gaschromatographie: Apiezon L auf Gaschrom P (siehe 2.8.8.2.). Das PE von Stamm T114GP wurde säulenchromatographisch, das des Stammes K12Ymel dünnschichtchromatographisch gewonnen.



ten Fettsäuren lag unterhalb der gaschromatographischen Erfassungsgrenze (< 1 %). Auch bei einer gaschromatographischen Analyse nach Hydrierung und Bromierung der Probe (2.8.8.3.) ergaben sich keinerlei Hinweise für das Vorliegen von ungesättigten oder Cyclopropan-Fettsäuren. Die isolierten Lipidkomponenten wiesen folgende Phasenumwandlungstemperaturen auf:

Tabelle 11: Phasenumwandlungstemperaturen der Lipide des Stammes T114GP

	Meßmethode	T_t (°C) aufsteigend	absteigend
PE	Lichtstreuung Puffer 2	38	37
PG	Lichtstreuung Puffer 2	15	13
Zellen	PhNap-Fluoreszenz, Puffer 1	32,5	30,5

Die Phasenumwandlungstemperaturen von PE und PG differieren um etwa 25°C und liegen jeweils um einige Grad tiefer als die von analogen synthetischen Dimyristyroyl(14:0/14:0)-Präparaten (siehe Tabelle 5). Die Lipidphasenumwandlungstemperatur der Membranlipide in ganzen Zellen liegt aufgrund des hohen PG-Gehalts (Zusammensetzung: 77 % PE / 22 % PG / <1 % CL) um ca. 6°C unter der des reinen Phosphatidylathanolamins.

Die Zellen des Stammes T114GP sind kältesensitiv und nur bei Temperaturen oberhalb von 33°C zum Wachstum fähig. Die Lipide der bei 33°C wachsenden Zellen liegen zum Teil in der Gelphase vor (T_t ca. 32°C). Hieraus läßt sich ableiten, daß fluide Membranbereiche für die Zellen essentiell sind. Erstaunlich ist, daß die Membranfunktionen trotz der Verkürzung der mittleren Kettenlänge der lipid-assoziierten Fettsäuren von ca. 16 - 17 bei Wildtypzellen auf 14 Kohlenstoffatome bei Stamm T114GP (siehe Abb. 23) und der damit verbundenen Reduktion der Dicke der Lipidmatrix erhalten bleiben. Interessante Parallelen ergeben sich zu einigen Experimenten von Silbert et al. (131), die das Wachstum des Stammes K1060

(im wesentlichen identisch mit Stamm T20GP) bei Supplementierung mit einer verzweigtkettigen Fettsäure (12-Me-14:0) untersuchten. Nach dem Umsetzen auf dieses Supplement akkumulierten die Zellen ungewöhnlich kurzkettige Fettsäuren und stellten trotz Inkorporation der exogenen Fettsäure ihr Wachstum nach wenigen Generationen ein. Auch hier war es jedoch möglich, einen mit 12-Me-14:0-Supplement kontinuierlich wachsenden Stamm K1060 B5 mit einer nicht näher charakterisierten Sekundärmutation zu isolieren. Die Fettsäurezusammensetzung dieses kontinuierlich wachsenden Derivats (12 % 12:0 / 32 % 14:0 / 11 % 16:0 / 45 % 12-Me-14:0) differierte nicht stark von der des Ausgangsstammes bei Einstellung des Wachstums. Eine vergleichende Analyse der Sekundärmutationen der Stämme T114GP und K1060B5 könnte möglicherweise wichtige Einblicke in Regulationsmechanismen der Lipidsynthese geben.
Mit der Isolierung des kontinuierlich wachsenden Stammes T114GP ist klar gezeigt, daß die speziellen Packungseigenschaften von Fettsäuren mit von gesättigten Alkanketten abweichender Geometrie keine essentielle Rolle bei der funktionellen Integration von Membranproteinen spielen. Entscheidend ist dagegen, daß die Zellen durch Inkorporation solcher Fettsäuren die Phasenumwandlungstemperatur der Lipide unter die Wachstumstemperatur herabsetzen können.
Voraussetzung für die Isolierung des Stammes T114GP war die Einführung der cls-Mutation.
Durch Veränderung der Kopfgruppenzusammensetzung (PG-Akkumulation) konnte der bakterizide Effekt der fabB-Mutation partiell ausgeglichen werden. Diese kompensatorische Wechselbeziehung zwischen der Struktur der polaren und apolaren Teile der Phospholipide zeigt , daß die physikalischen Eigenschaften der Lipidphase von größerer Bedeutung sind als die spezifische chemische Struktur der einzelnen Lipidkomponenten.

3.3. Untersuchung der Konformation der Phospholipide in den Membranen von E.coli

In biologischen Membranen stehen integrale Membranproteine in direktem Kontakt mit den hydrophoben Bereichen der Lipidmatrix. Es ist anzunehmen, daß die Lipidmoleküle in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Aminosäure-Seitenketten der Proteine andere physikalische Eigenschaften aufweisen, als in reinen Lipiddoppelschichten. Über Ausmaß und biologische Bedeutung der von den Proteinen hervorgerufenen Störungen der dynamischen Konformation der Lipide herrscht Unklarheit.
Aufgrund von ESR-spektroskopischen Untersuchungen wurde angenommen, daß integrale Membranproteine von einer langlebigen monomolekularen Schicht von immobilisierten Lipidmolekülen (Halo-Lipid, Annulus-Lipid, boundary layer lipid) umgeben sind, die nur langsam mit der übrigen Lipidphase (bulk lipid phase) ausgetauscht werden.
Einige Autoren haben vermutet, daß sich die von den Proteinen hervorgerufenen Störungen über drei (81) oder bis zu sieben (35) Lipidschichten hin fortsetzen.
Vor allem aus den Ergebnissen von Fluoreszenz- und ESR-spektroskopischen Untersuchungen wurde abgeleitet, daß Membranproteine die Mikroviskosität der Lipidphase erhöhen.
Bei einer noch sehr begrenzten Zahl von Laser-Raman-spektroskopischen Messungen wurde beobachtet, daß sich bei Anwesenheit integraler Membranproteine die Anzahl der gauche-Konformationen der Lipidkohlenwasserstoffketten reduziert.
NMR-spektroskopische Untersuchungen (^{1}H, ^{2}H, ^{19}F-Kerne) gaben keine Hinweise für die Existenz von zwei separaten Lipiddomänen (boundary und bulk lipid). Membranproteine scheinen aber den Ordnungszustand der Lipidkohlenwasserstoffketten generell herabzusetzen. Eine konsistente molekulare Interpretation für die oben geschilderten und in einem Übersichtsartikel von Chapman et al. (26) zusammengefaßten Ergebnisse steht noch aus.

Deuteriummagnetische Resonanzspektroskopie (DMR)

Mit Hilfe der DMR kann man die Struktur von biologischen und synthetischen Membranen störungsfrei untersuchen. Von deuterierten Molekülen, die sich in einer isotropen Umgebung befinden, erhält man DMR-Spektren, die aus einer einzigen Absorptionslinie bestehen. In Lipidaggregaten sind jedoch bestimmte Orientierungsmöglichkeiten der Moleküle zueinander ausgezeichnet. Bedingt durch das Quadrupolmoment des Deuteriumkerns führt die anisotrope Ordnung zu einer Aufspaltung der DMR-Linie, wobei die Größe der Quadrupol-Aufspaltung ein Maß für die mittlere Orientierung des deuterierten Molekülsegmentes relativ zur Membranebene darstellt (zur Theorie siehe Ref. 122).

Für quantitative Vergleiche wird üblicherweise der Deuterium-Ordnungsparameter $|S_{CD}|$ eingeführt, der sich aus der experimentell zu beobachtenden Quadrupol-Aufspaltung $\Delta\nu_Q$ nach der Formel $\Delta\nu_Q = (3/4)(e^2qQ/h)|S_{CD}|$ berechnen läßt. Die statische Quadrupol-Kopplungskonstante (e^2qQ/h) beträgt 170 kHz für aliphatische und 175,3 kHz für olefinische Deuteronen. Der Ordnungsparameter hängt mit den Fluktuationen des Winkels zusammen, den der C-D-Bindungsvektor mit der Normalen zur Membranebene bildet:

$$|S_{CD}| = (1/2)(\overline{3\cos^2\theta} - 1)$$

Der Strich weist darauf hin, daß hier das zeitliche Mittel über alle Bewegungen eingeht, die schnell im Vergleich mit der charakteristischen Zeit eines DMR-Meßprozesses($>10^{-4}$ sec) sind.

Intensive Untersuchungen an reinen Lipiddoppelschichten aus spezifisch deuterierten synthetischen Phospholipiden haben wertvolle Aufschlüsse über die Konformation der polaren und apolaren Molekülteile geliefert (122).

Mehrere Arbeitsgruppen haben in jüngster Zeit auch rekonstituierte Systeme aus isolierten Membranproteinen und deuterierten Lipiden untersucht (26, 94, 126) und wie bei reinen Lipidsystemen jeweils nur ein Linienpaar - allerdings mit reduzierter Quadrupol-Aufspaltung - gefunden. Ergebnisse von Dahlquist et al. (36), die auf die Existenz von zwei seperaten

Lipidkomponenten (boundary und bulk lipid) hindeuteten, waren nicht reproduzierbar.

Daß man DMR-Spektren auch von intakten biologischen Membranen nach biosynthetischer Inkorporation von deuterierten Fettsäuren in die Lipide erhalten kann, wurde zuerst für Acholeplasma laidlawii gezeigt (93, 136). In einem analogen experimentellen Ansatz sollte im Rahmen dieser Arbeit die dynamische Konformation der Lipidmoleküle in E.coli-Membranen untersucht werden. Aufgrund der weniger komplexen Lipidzusammensetzung, die durch Einführung der cls-Mutation noch weiter vereinfacht werden kann, erscheint E.coli als ein für diese Zwecke weit besser geeignetes Modellsystem als A.laidlawii.
Die hier verwendeten E.coli-Stämme enthielten neben der cls-Mutation noch einen Defekt im Fettsäureabbau (fadE). Damit war sichergestellt, daß die zugegebenen deuterierten Fettsäuren unverändert in die Phospholipide inkorporiert wurden. Zum Einbau von deuterierter Elaidinsäure wurden Zellen des bereits beschriebenen Stammes T2GP (fabB, fadE, cls) verwendet, die selbst keine ungesättigten Fettsäuren synthetisieren können.
Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. H.U.Gally und Prof. J.Seelig (Biozentrum Basel) durchgeführt.

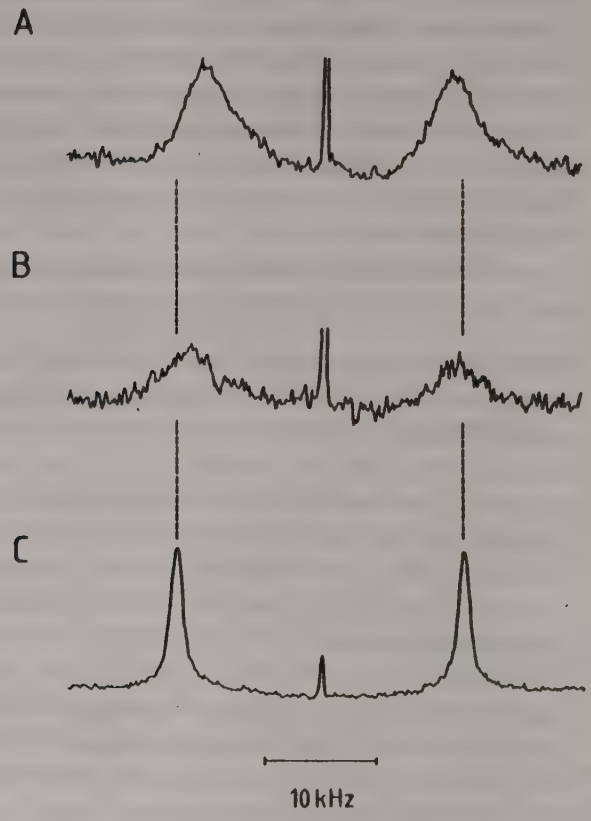
Im ersten Experiment wurden Zellen des Stammes T2GP bei 40°C in Gegenwart von 9,10-D_2-Elaidinsäure angezogen. Abb. 24 zeigt DMR-Spektren von Fraktionen der inneren und der äußeren Membran (Präparation siehe: 2.7.2./2.8.12.) und von Liposomen aus den extrahierten Lipiden. Die von ganzen Zellen gewonnenen Spektren (nicht gezeigt) ähneln denen der Cytoplasmamembran. Alle Spektren weisen nur ein Linienpaar auf und sind charakteristisch für eine flüssig-kristalline Lipiddoppelschicht.
Die Ergebnisse der Messungen an Zellen, Membranfraktionen und Liposomen sind einander in Abb. 25 gegenübergestellt. Der Ordnungsparamter der Kohlenwasserstoffketten nimmt in der Reihenfolge innere Membran < äußere Membran < reine Lipidvesikel zu. Die Unterschiede zwischen Zellen und iso-

Abb. 24: DMR-Spektren von Membranen und Lipiden des Stammes T2GP mit 9,10-D_2-Elaidinsäure als Supplement

A: Innere Membran, gemessen bei 41°C in 0,1 M NaCl, 0,01 M Natriumphosphat, 0,01 M $MgCl_2$ (pH 7,0). Die Zugabe von Magnesiumionen hatte keinen Einfluß auf die von Membranen erhaltenen Spektren

B: äußere Membran; Meßbedingungen wie bei A

C: Liposomen aus den extrahierten Phospholipiden, gemessen bei 36°C in 0,1 M NaCl, 0,01 M Natriumphosphat, 0,001 M EDTA. Das zentrale Signal ist auf das natürliche Vorkommen von DHO zurückzuführen.



lierten Membranen sind gering. Im folgenden wurde daher auf Membrantrennungen verzichtet.

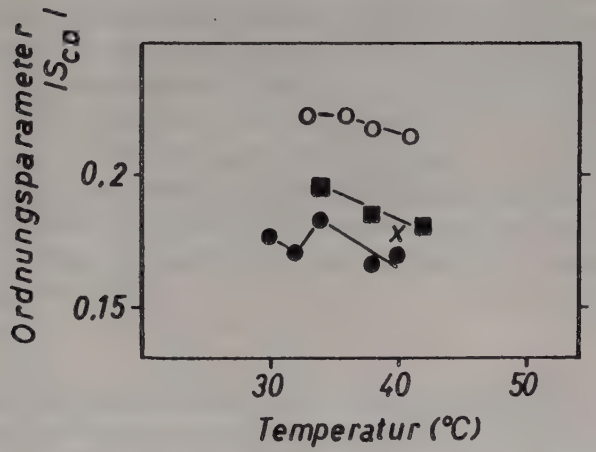


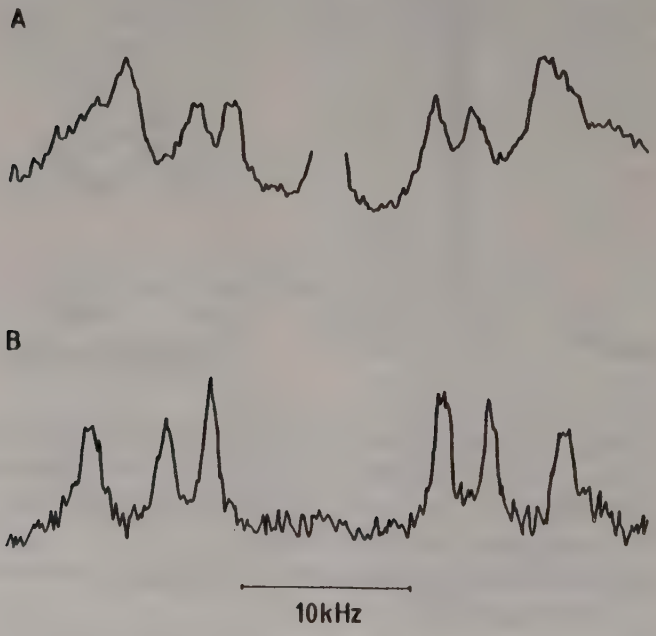
Abb. 25: Temperaturabhängigkeit des Ordnungsparamters: Stamm T2GP mit 9,10-D_2-Elaidinsäure als Supplement. Vergleich zwischen Zellen, isolierten Membranen und Liposomen aus den extrahierten Phospholipiden.

○ Liposomen in 0,1 M NaCl, 0,01 M Natriumphosphat, 0,001 M EDTA (pH 7,0)

■ äußere Membran, ● innere Membran, ✕ Zellen mit 0,01 M $MgCl_2$ anstelle von EDTA

Im zweiten Experiment wurde 2,2-D_2-Elaidinsäure in die Membranlipide des Stammes T2GP inkorporiert. Die in Abb. 26 wiedergegebenen Spektren zeigen, daß die Konformationen der Kohlenwasserstoffketten in der Nähe der polaren Kopfgruppen in Zellen und Liposomen weitgehend identisch sind. Vergleichbare spektrale Muster wurden auch bei Doppelschichten von PC, PE und PS gefunden (124). In allen diesen Systemen er-

Abb. 26: DMR-Spektren von Zellen und Liposomen des Stammes T2GP mit 2,2-D_2-Elaidinsäure als Supplement.
A: Zellen in 0,1 M NaCl, 0,01 M Pipes (pH 7,0), 0,01 M $MgCl_2$ bei 36°C
B: Liposomen aus den extrahierten Lipiden in 0,1 M NaCl, 0,01 M Natriumphosphat (pH 7,0), 0,01 M EDTA bei 41°C

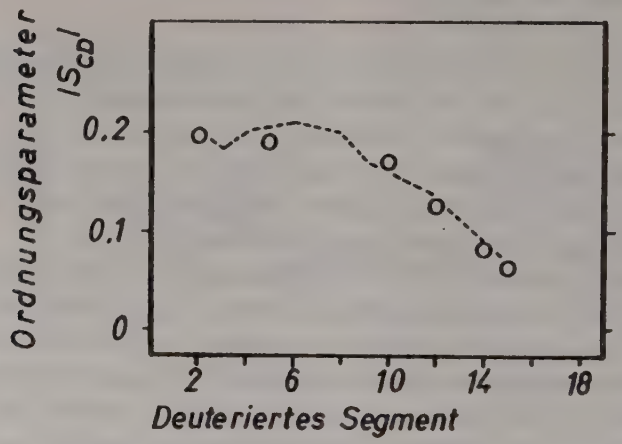


hält man drei Quadrupol-Aufspaltungen. Basierend auf Untersuchungen mit synthetischen Phospholipiden, die nur an einer Fettsäurekette deuteriert waren, kann man die Spektren wie folgt deuten. Die breiteste Aufspaltung ist den Deuteronen der sn1-Kette und die beiden kleineren Aufspaltungen denen der sn2-Kette zuzuschreiben (122, 127). Die Unterschiede in der Quadrupol-Aufspaltung können mit einem Strukturmodell erklärt werden, bei dem alle Segmente der sn1-Kette im Mittel rechtwinklig zur Membranoberfläche stehen, während die sn2-Kette zunächst parallel zur Membranoberfläche verläuft und erst hinter dem C2-Segment rechtwinklig abknickt. Dieses Modell steht in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der einzigen veröffentlichten Einkristall-Röntgenstrukturanalyse einer (PE)-Lipiddoppelschicht (59) und mit Neutronenstreuungsuntersuchungen an selektiv deuterierten Doppelschichten von PC (16).

Meßreihen an Lipidsuspensionen, bei denen die Fettsäuren an verschiedenen Positionen der Kohlenwasserstoffkette deuteriert sind, geben Aufschluß über den Verlauf der Ordnung entlang der Normalen zur Membranebene. Solche Doppelschichtprofile sind für verschiedene Phospholipide (124) und für A. laidlawii (136) veröffentlicht worden.
Allgemein bleibt die innere Ordnung der Fettsäureketten entlang der ersten zehn Kettensegmente relativ konstant und nimmt erst im Bereich der terminalen Kohlenstoffatome rasch ab. ESR-spektroskopische Messungen mit organischen Nitroxid-Radikalen als Spinlabel hatten dagegen zunächst auf ein exponentielles Abfallen der Ordnung vom zweiten zum terminalen Segment hingedeutet (64). Diese Unterschiede zu den mit Hilfe der DMR-Spektroskopie gewonnenen Ergebnissen werden von den meisten Autoren auf die störenden Einflüsse der Radikalsonden zurückgeführt. In neuerer Zeit wird daher bei strukturellen Untersuchungen in immer stärkerem Maße auf störungsfreie Meßmethoden zurückgegriffen.
Zur Bestimmung des Ordnungsprofils der Kohlenwasserstoffketten von Phospholipiden in den E. coli-Membranen wurden Zellen des Stammes T106GP (fadE, cls) in Gegenwart selektiv deute-

rierter Palmitinsäuren (16:0) angezogen (siehe 2.8.12.). Abb. 27 zeigt die Veränderungen des Ordnungsparamters $|S_{CD}|$ mit der Position des deuterierten Segments. Der Verlauf des Ordnungsprofils stimmt weitgehend mit dem von vergleichbaren reinen Phospholipidsystemen überein.

Abb. 27: Veränderung des DMR-Ordnungsparamters mit der Position des deuterierten Segmentes.
Zellen des Stammes T106GP (fadE, cls) wurden mit verschiedenen selektiv deuterierten Palmitinsäuren angezogen und nach dem Waschen in 0,1 M NaCl, 0,01 M $MgCl_2$, 0,01 M Pipes (pH 7,0) resuspendiert. DMR-Spektren wurden bei 40°C aufgenommen. Das Ordnungsprofil von 1-Palmitoyl-2-oleoyl-Lecithin (125) wurde als gestrichelte Linie eingezeichnet.



Die hier von Zellen und Membranen erhaltenen DMR-Spektren sind sowohl mit einer Organisation der Lipide in Form einer Doppelschicht als auch einer Einzelschicht vereinbar, wie sie für die äußere Membran diskutiert wird (12). Wie in rekostituierten Systemen (26, 94, 126) ist der Ordnungsparamter in den E.coli-Membranen kleiner als in reinen Lipiddoppelschichten. Dieser Effekt läßt sich wie folgt interpretieren (126).

Dicht gepackte Lipid-Protein-Doppelschichten bilden sich nur aus, indem die Kohlenwasserstoffketten der Membranlipide die Lücken in den irregulären Oberflächen der integralen Membranproteine ausfüllen. Gleichzeitig finden, auf die Meßdauer bezogen, rasche Platzwechselvorgänge statt. Auslenkung der Ketten und hohe Austauschfrequenz ($>10^4$ Hz) haben zur Folge, daß die mittlere Ordnung aller Kohlenwasserstoffketten abnimmt. Die mit Hilfe der DMR-Spektroskopie erhaltenen Ergebnisse widerlegen die Vorstellung, daß integrale Membranproteine von einer langlebigen Schicht immobilisierter Lipide umgeben sind. Wichtig ist, daß strukturelle und dynamische Aspekte bei der Interpretation der Spektren klar voneinander getrennt werden müssen. Der DMR-Ordnungsparamter ist ein Maß für die mittlere Konformation und Orientierung der Kohlenwasserstoffketten und erlaubt keine Aussage über die Geschwindigkeit von Reorientierungsprozessen (122, 126).

Die DMR-Spektroskopie ist eine äußerst sensitive Methode für den Nachweis von Konformationsänderungen. So haben von Cholesterin oder polyvalenten Kationen hervorgerufene Veränderungen der Phospholipidkonformation starke Auswirkungen auf die DMR-Spektren. Der Einfluß der Proteine in biologischen und rekonstituierten Membranen ist vergleichsweise gering. Sieht man von der allgemeinen Erniedrigung des Ordnungsparamters ab, so stimmen die DMR-Spektren von E.coli-Membranen mit denen von reinen Phospholipiddoppelschichten in bemerkenswerter Weise überein. Dieser sensitive Nachweis für die Konstanz der Phospholipidkonformation rechtfertigt den Ansatz, reine Lipid-Wasser-Systeme experimentell als Modelle für die proteinfreien Bereiche biologischer Membranen zu verwenden.

3.4. Membranfusion

Membranfusionen treten bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen, wie Phagozytose, Sekretion, Zellteilung und Befruchtung auf. Eine detaillierte molekulare Beschreibung der dabei zugrunde liegenden Mechanismen steht noch aus (107). Um zu einem besseren Verständnis dieser Prozesse zu gelangen, sind in den vergangenen Jahren intensive Untersuchungen mit dem Ziel unternommen worden, kontrollierte Fusionen zwischen künstlichen Vesikeln, Vesikeln und Zellen sowie Zellen untereinander zu induzieren (107).
Bei Abwesenheit oberflächenaktiver Agentien sind Phospholipidvesikel äußerst stabile Strukturen. In Abhängigkeit von der Ladungsdichte an ihrer Oberfläche führen elektrostatische Kräfte zu einer Abstoßung zwischen ihnen. Starke Hydratationskräfte müssen darüber hinaus bei einer Annäherung der Membranen auf Abstände von weniger als 30 Å überwunden werden (31). Bei Kollisionen bilden sich unter normalen Bedingungen keine Kontaktstellen aus, die eng genug wären, um die Vereinigung der Lipide zweier Vesikel zu einer kontinuierlichen gemeinsamen Membran zu ermöglichen.
Untersuchungen von Duckwitz-Peterlein et al. (44) zeigten, daß zwei zusammen inkubierte Populationen von E.coli-Lipidvesikeln ihre Lipide nicht über Fusions- oder Kollisionsprozesse vermengen, sondern durch Austausch von einzelnen Molekülen oder Micellen über die Wasserphase. Da die Phospholipide äußerst geringe Monomerkonzentrationen aufweisen, sind diese Austauscheffekte sehr langsam. Man beobachtet, abhängig von der Lipidstruktur, Halbwertszeiten von vielen Stunden bis zu mehreren Tagen (138). Auch Vesikel aus E.coli-Membranen fusionieren nicht bei einfacher Inkubation (41).
Zahlreiche Studien haben gezeigt, daß man Vesikel aus anionischen Lipiden (CL, PS, PG, PA) durch sequentielle Zugabe von Calcium-Ionen und EDTA fusionieren kann (107, 145). Bei der Bildung der gut untersuchten Calcium-Phosphatidylserin-Komplexe wird das Wasser aus der Region der polaren Kopfgruppen freigesetzt. Der wässrige Interlamellarraum kollabiert und es kommt zur Präzipitation von dicht gepackten, dehydratisierten

Lamellen mit hochgeordneten Kohlenwasserstoffketten (54, 90). Diese charakteristisch geformten, zylindrischen Strukturen (Cochleat-Zylinder (104, 149)) lagern sich bei Zugabe von überschüssigen EDTA-Mengen in große, geschlossene, unilamellare Vesikel um. Durch Calcium-Ionen lassen sich auch Vesikel fusionieren, die aus Mischungen von PC und PS bestehen (103). Dabei können laterale Phasenseparationen auftreten (103, 147).

Miller und Racker zeigten kürzlich, daß die Fusion von Lipidvesikeln ein wertvolles Hilfsmittel bei der Rekonstitution membrangebundener Multienzymsysteme sein kann (85). Auch eine Methode zur Fusion von Vesikeln aus biologischen Membranen könnte von großem Wert bei der Untersuchung membrangebundener Zellfunktionen (Komplementationsexperimente) sein.

Versuche, E.coli-Membranen mit normaler Lipidzusammensetzung zu fusionieren, waren bislang nur bedingt erfolgreich (41). Die oben beschriebenen Untersuchungen zur Ca^{2+}-induzierten Fusion PS-haltiger Lipidvesikel gaben Anlaß zu den folgenden Experimenten, deren Ziel es war, E.coli-Membranvesikel mit erhöhter Oberflächenladung zu fusionieren. Lipide und Membranen wurden hierbei von temperatursensitiven Stämmen mit konditionalem Defekt in der PS-Decarboxylase gewonnen. Diese Mutanten akkumulieren bei nicht-permissiver Temperatur ($42^{o}C$) PS (56).
Als Indikator für eine Fusion wurde zunächst die Lipidphasenumwandlung verwendet. Zwei PS-haltige Vesikelpopulationen mit unterschiedlicher Fettsäurezusammensetzung - und daraus sich ergebend, unterschiedlicher Lipidphasenumwandlungstemperatur - wurden zusammen inkubiert. Es ist anzunehmen, daß eine Fusion aufgrund der hohen lateralen Beweglichkeit von Membranlipiden in einer fluiden Doppelschicht zu einer raschen Vermischung der Lipide führt. Die stufenweise Lipidphasenumwandlung des Vesikelgemisches sollte daher nach erfolgter Fusion in die einheitliche mittlere Phasenumwandlung der Mischvesikel übergehen. Um die Fettsäurezusammensetzung der Membranlipide kontrollieren zu können, mußte zunächst ein E.coli-Stamm konstruiert werden, der neben der psd-Mutation noch

Defekte in Fettsäuresynthese (fabB) und -abbau (fadE) enthält.

3.4.1. Kombination der psd-Mutation mit Defekten in Fettsäuresynthese (fabB) und -abbau (fadE)

Versuche, das mutierte psd-Allel durch Kotransduktion mit dem auf dem E.coli-Chromosom eng benachbarten Ampicillin-Resistenz-Gen in den Stamm K1062 (fabB, fadE) zu übertragen, mißlangen. Es stellte sich heraus, daß der Fettsäure-auxotrophe Rezeptorstamm hypersensitiv gegenüber Ampicillin ist. Als Alternative bot sich an, das psd-Allel durch Konjugation zu übertragen. Hierzu mußte zunächst ein Hfr-Stamm konstruiert werden, mit dessen Hilfe das mutierte psd-Allel übertragen werden kann.

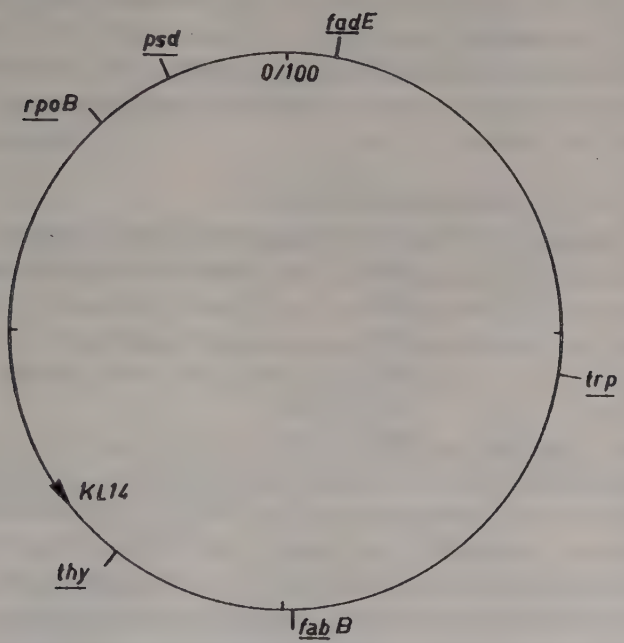
3.4.1.1. Isolation eines Hfr-Stammes mit temperatursensitiver PS-Decarboxylase

Da die psd-Mutation einen temperatursensitiven Phänotyp hervorruft, mußten alle Schritte bei 30°C durchgeführt werden. Es wurden Medium 2-Platten mit Wuchsstoffen und Antibiotika in den angegebenen Konzentrationen (2.5.1.) verwendet. Von dem Ausgangsstamm EH150 (F^-, psd) wurde über Trimethoprim-Platten (2.6.8.) ein Thymin-bedürftiger Stamm selektioniert und von diesem ein Rifampicin-resistentes Derivat (2.6.7.), T91GP (F^-, psd, thyA, rpoB) gewonnen. Dieser Stamm wurde bei 30°C 2 Stunden mit dem Hfr-Stamm KL14 gekreuzt. Es wurde auf das vom Donor als späte Marke übertragene $thyA^+$-Allel selektioniert (siehe Abb. 28). Zur Gegenselektion wurde die Resistenz gegen Rifampicin ausgenutzt. Von 31 untersuchten Rekombinanten waren 29 temperatursensitiv. Von diesen wiesen in Testkreuzungen 16 Hfr-Eigenschaften auf. Von einem dieser Stämme wurde über Trimethoprim-Platten ein Thymin-bedürftiges Derivat isoliert: T94GP (Hfr, psd, thyA, rpoB).

3.4.1.2. Übertragung des mutierten psd-Allels durch Konjugation

Mit dem Hfr-Stamm T94GP konnte die psd-Mutation in den Stamm T51GP (F^-, fabB, fadE, trp) übertragen werden. Bei der Kreuzung wurde die Rifampicin-Resistenz zur Selektion und das Thymin-Bedürfnis des Donors zur Gegenselektion verwendet.

Abb. 28: Ausschnitt aus der Genkarte von E.coli K12 (6). Der Pfeil gibt Ursprung und Richtung des Chromosomentransfers durch den Hfr-Stamm KL14 an.



Das Kreuzungsgemisch wurde erst nach einigen Stunden auf selektive Platten ausgestrichen, um zuvor die Expression der Rifampicin-Resistenz in den Rekombinanten zu erlauben. Von 10 untersuchten Rekombinanten waren drei temperatursensitiv (psd). Alle drei wiesen den gleichen Genotyp auf (fabB, fadE, trp, psd, rpoB). Aus einem dieser Stämme wurden durch Transduktion mit Stamm T1GP (cls^-, trp^+) als P1-Donor die Tryptophan-prototropen Stämme T81GP (fabB, fadE, psd, cls, rpoB) und T82GP (fabB, fadE, psd, rpoB) gewonnen.

3.4.2. Charakterisierung der Stämme T81GP und T82GP

3.4.2.1 Wachstum mit verschiedenen Fettsäuresupplementen

In Medium 7 mit Ölsäure-(cis-Δ^9-18:1) als Supplement wuchsen beide Stämme sowohl bei 28°C als auch bei der für Stämme mit psd-Allel semipermissiven Temperatur von 33°C mit gleicher

Generationszeit.
Mit Palmitelaidinsäure-(trans-Δ^9-16:1)-Supplement war bei 30°C nur der Stamm T81GP (cls) zum Wachstum fähig. Dies stimmt gut mit dem Wachstumsverhalten der Stämme T2GP (cls, fabB, fadE) und T20GP (fabB, fadE) überein (siehe 3.2.3.). Bei 33°C wuchs mit Palmitelaidinsäure-Supplement nur der Stamm T82GP. Die Ursache für dieses unerwartete Verhalten des Stammes T81GP ist unklar.

3.4.2.2. Temperatursensitivität

Die Stämme T81GP und T82GP unterschieden sich nicht signifikant im Wachstumsverhalten bei nicht-permissiver Temperatur, unabhängig davon, ob Ölsäure, Palmitelaidinsäure oder Elaidinsäure zur Supplementierung verwendet wurde. Bei 42°C stellten die Zellen in jedem Fall ihr Wachstum nach wenigen Generationen ein.
Hawrot und Kennedy (56) haben gezeigt, daß das Ausmaß der PS-Akkumulation bei hoher Temperatur stark vom genetischen Hintergrund einer psd-Mutante und der Art des verwendeten Mediums abhängt. In reichen Medien sind generell stärkere Verschiebungen der Lipidzusammensetzung zu beobachten. Auch bei den Stämmen T81GP und T82GP akkumulierte bei 42°C in Vollmedium 1 mehr Phosphatidylserin als in dem ärmeren Medium 7 (beide Medien mit Fettsäure-Supplement).

3.4.2.3. Lipidzusammenstzung nach Temperatur-induzierter Einstellung des Wachstums

Exponentiell bei 28°C in Medium 1 mit Ölsäure-Supplement wachsende Zellen wurden abzentrifugiert, gewaschen und bei 42°C in Medium 1 mit Palmitelaidinsäure-Supplement weiter inkubiert. Nach 3 Stunden nahm die optische Dichte der Kulturen nicht mehr weiter zu. Die Zellen wurden geerntet und die Lipide extrahiert. In Tabelle 12 sind die analytischen Daten der Lipide zusammengefaßt.
Bei 42°C kam es bei beiden Stämmen zu einer ähnlich starken Akkumulation von Phosphatidylserin wie bei dem Ausgangsstamm EH150 (105). Bei Stamm T81GP liegt die Phasenumwandlungstempe-

Tabelle 12: Eigenschaften der extrahierten Lipide. Die zusammensetzung der Lipide wurde wie beschrieben (2.8.6./2.8.8.), die Phasenumwandlungstemperatur mit PhNap als Indikator ermittelt (2.8.10.1.).

Stamm		T81GP	T82GP
Kopfgruppen-Zusammensetzung (Mol% Phosphat)	PE	40	33
	PS	34	36
	CL	2	28
	PG	24	3
Fettsäure-Zusammensetzung (Mol%)	12:0	2	1
	14:0	7,5	10
	16:0	25	30
	18:0	1	-
	trans-16:1	58	55,5
	cis -18:1	6,5	3,5
Phasenumwandlungstemperatur (^{o}C)		23	31,5
+ 3 mM Ca^{2+}		35	45,5

ratur der Lipide tiefer als bei Stamm T82GP. Dies ist auf den großen Unterschied im PG-Gehalt zurückzuführen (siehe 3.2.). Die Phasenumwandlungstemperatur von PS liegt nur wenig tiefer als die von PE (siehe Tabelle 5). Der partielle Austausch des PE durch PS hat daher nur geringe Auswirkungen auf die Phasenumwandlungstemperatur der Membranlipide.
Die Zugabe von Calcium-Ionen führte zu einer Verschiebung der gesamten Phasenumwandlung zu einer um mehr als 10^{o}C höheren Temperatur. Diese Verschiebung ließ sich durch Zugabe überschüssiger EDTA-Mengen vollständig rückgängig machen. Die beobachteten Phasenumwandlungskurven gaben keine Hinweise für das Auftreten von lateralen Phasenseparationen.

3.4.3. Hybridisierung von Lipidvesikeln

Miller und Racker (85) haben gezeigt, daß der minimale Gehalt an PS, bei dem Lipidvesikel sich noch durch Zugabe von Calciumionen fusionieren lassen, bei ca. 35 % liegt. Eine solch star-

ke Akkumulation von PS konnte bei den Stämmen T81GP und T82GP nur durch Wachstum bei 42°C in Vollmedium 1 (mit Fettsäuresupplement) induziert werden. Unter diesen Bedingungen war jedoch die Inkorporationsrate von exogenen Fettsäuren relativ gering. Die extrahierten Lipide wiesen daher breite Phasenumwandlungsbereiche auf.

Eine Durchmischung der Lipide verschiedener Vesikelpopulationen (Hybridisierung) kann man durch Analyse der Phasenumwandlung nur dann klar nachweisen, wenn die Umwandlungsbereiche der Ausgangsvesikel gut voneinander getrennt sind. Membranlipide der Stämme T81GP und T82GP mit hohem PS-Gehalt wiesen unabhängig von der Art des Fettsäuresupplements relativ breite und stark überlappende Phasenumwandlungsbereiche auf. Im folgenden Versuch wurde deshalb eine Lipidfraktion verwendet, bei der die ungesättigten Fettsäuren durch katalytische Hydrierung in gesättigte umgewandelt worden waren. Die Lipide wiesen nach der Hydrierung eine schärfere und zu höherer Temperatur hin verschobene Phasenumwandlung auf. Zellen des Stammes T81GP wurden wie unter 3.4.2.3. beschrieben mit Palmitelaidat als Supplement angezogen und die Lipide extrahiert (Zusammensetzung: siehe Tabelle 12). Ein Teil des Lipidextraktes wurde katalytisch hydriert (2.8.9.). Fettsäurezusammensetzung nach der Hydrierung: 1 % 12:0 / 9 % 14:0 / 3 % 16:1 / 82 % 16:0 / 5 % 18:0.

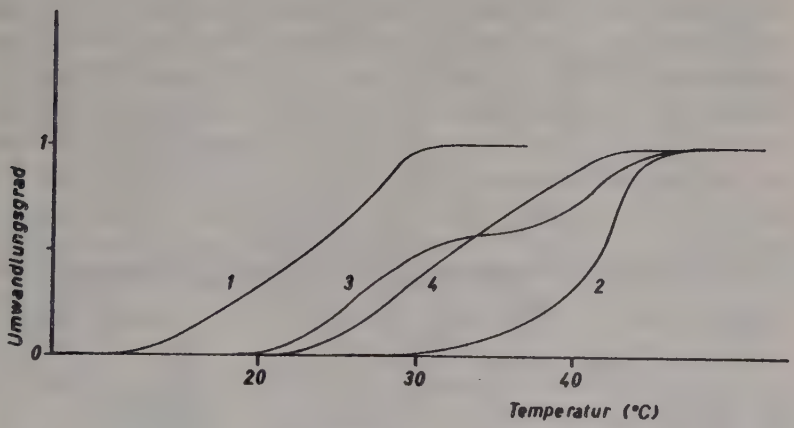
Proben des hydrierten und des nicht hydrierten Lipides wurden in Puffer 2 suspendiert, 15 Minuten bei 50°C beschallt (2.8.10.) und anschließend getrennt voneinander für 2 Stunden bei 45°C inkubiert.

Gleiche Volumina der beiden Dispersionen (Lipidgehalt 2×10^{-4}M) wurden gemischt und das Gemisch in zwei Proben aufgeteilt. Ein Teil wurde drei Stunden bei 50°C inkubiert. Kurve 3 in Abb. 29 zeigt den Verlauf der beiden aufeinanderfolgenden Phasenumwandlungen. Dreimaliges Aufwärmen und Abkühlen bei der Messung hatte keinen Einfluß auf den Verlauf der Kurve. Zum zweiten Teil der Mischsuspension wurden Calcium-Ionen (Endkonzentration 3 mM), eine halbe Stunde später EDTA (Endkonzentration 10 mM) zugegeben und abermals eine Stunde spä-

ter die Phasenumwandlungskurve aufgenommen (Kurve 4). Die Ergebnisse deuten auf eine Hybridisierung der Vesikel hin.

Abb. 29: Hybridisierung von Lipidvesikeln durch sequentielle Zugabe von Ca-Ionen und EDTA. Die Kurven zeigen die normalisierten Veränderungen der PhNap-Fluoreszenzintensität bei ansteigender Temperatur. Zur Normalisierung siehe Abb. 14

1. nicht hydriertes Lipid
2. hydriertes Lipid
3. Vesikelgemisch
4. Vesikelgemisch nach sequentieller Zugabe von Ca-Ionen und EDTA



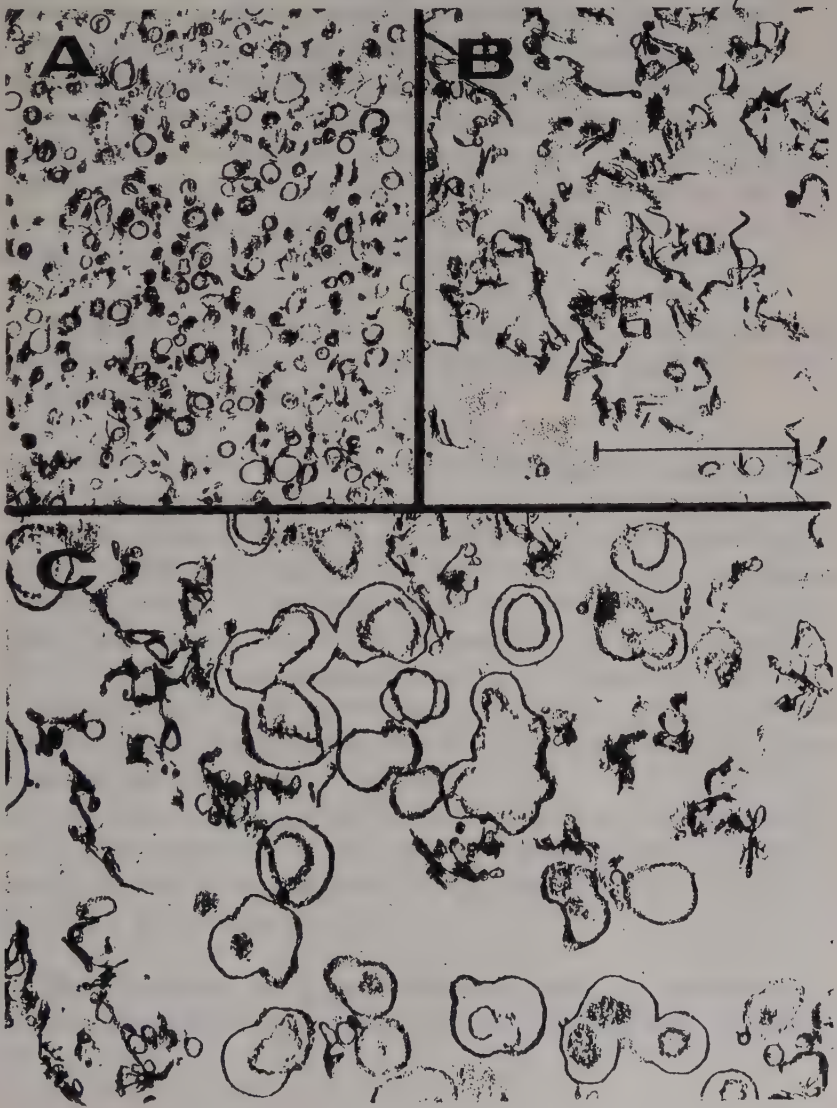
Das Auftreten der für die Durchmischung der beiden Komponenten charakteristischen Umwandlung erlaubt noch keinen Schluß auf den Mechnismus. Die Hybridisierung kann durch Vesikelfusion oder einen Austausch von Einzelmolekülen oder Micellen zustande kommen.
Endziel der hier angestellten Versuche war es, Vesikel aus E.coli-Membranen zu fusionieren. Um Schwierigkeiten bei der Hydrierung solcher Membranen zu umgehen und um die Fusions-

prozesse direkt nachweisen zu können, wurde in der Folge die Größenverteilung der Vesikel vor und nach Behandlung mit Calciumionen und EDTA elektronenmikroskopisch untersucht. Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. H. Schwarz durchgeführt.

3.4.4. Fusion von E.coli-Membranvesikeln

Exponentiell bei 30°C in Medium 1 wachsende Kulturen des Stammes EH150 (psd) wurden auf eine optische Dichte von 0,05 gebracht und gut belüftet bei 42°C weiter inkubiert. Als nach 2 1/2 Stunden keine weitere Zunahme der optischen Dichte der Kultur mehr zu beobachten war, wurden die Zellen geerntet und eine Cytoplasmamembran-Fraktion (L1 + L2-Bande) gewonnen (siehe 2.7.2.). Eine Phosphatbestimmung nach dünnschichtchromatographischer Trennung der Membranlipide ergab folgende Zusammensetzung: PE 43 % / PG 2 % / CL 21 % / PS 34 % (Mol% Phosphat). Die Membranen wurden in Puffer 2 suspendiert und in flüssigem Stickstoff gelagert. Nach dem Auftauen wurden sie 15 Minuten unter Stickstoff in einem Beschallbad bei 20°C mit Ultraschall behandelt und nach zweistündiger Inkubation für 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand (Lipidkonzentration ca. 1mM) wurde in 3 Portionen geteilt.
Probe 1 wurde 3 Stunden ohne Zusatz weiterer Agenzien inkubiert.
Zu Probe 2 wurden Calciumionen (Endkonzentration 10 mM) gegeben.
Zu Probe 3 wurden ebenfalls Calciumionen (Endkonzentration 10 mM) und nach 2 Stunden EDTA (Endkonzentration 20 mM) gegeben.
Alle drei Proben wurden nach insgesamt dreistündiger Inkubation bei 20°C durch Zugabe von Glutaraldehyd (Endkonzentration 2,5 %) fixiert . Eine halbe Stunde nach Zugabe des Aldehyds wurden die Membranen durch hochtourige Zentrifugation (60 Minuten, 300000 g) bei 0°C sedimentiert. Die Niederschläge wurden in Agar (1 %) eingeschlossen, mit Osmiumtetroxid (1 %) nachfixiert und mit Äthanol entwässert.
Abb. 30 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten der in Epon eingebetteten und mit Bleicitrat kontrastierten Membranen. Alle drei Bilder wurden bei glei-

Abb. 30: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten der Cytoplasmamembran des Stammes EH150
A ohne Zusatz
B nach Zugabe von Ca^{2+}-Ionen
C nach sequentieller Zugabe von Ca^{2+}-Ionen und EDTA
Alle drei Proben sind bei gleicher Vergrößerung aufgenommen.
Der Balken in Abb. 30 B entspricht einem Abstand von 1 µm.



cher Vergrößerung aufgenommen und sind repräsentativ für die Gesamtproben. Man sieht, daß die kleinen Ausgangsvesikel bei Zugabe von Calciumionen kollabieren und sich nach Zugabe von EDTA zum Teil in weit größere Strukturen umlagern.
Bemerkenswert ist, daß die Fusionsprozesse durch den hohen Proteingehalt der Membranen nicht unterbunden werden. Erst funktionelle Untersuchungen (Komplementationsexperimente) werden in der Zukunft Aufschluß über den allgemeinen Wert der beschriebenen Fusionsmethode geben können.

4. Diskussion

Am Beispiel des Modellsystems E.coli befaßt sich die vorliegende Doktorarbeit mit der Struktur und Funktion von Phospholipiden in biologischen Membranen.

Mit den zur Verfügung stehenden Mutanten der Lipidsynthese ist E.coli das zur Zeit beste System zur Analyse der Auswirkungen, die sich aus Veränderungen der Lipidzusammensetzung für die strukturellen und funktionellen Eigenschaften einer biologischen Membran ergeben. Bei den Zellen mit veränderter Lipidzusammensetzung kann man das Wachstumsverhalten als einen sensitiven Indikator für die Aufrechterhaltung der essentiellen Membranfunktionen ansehen.

Im folgenden sollen die hier im Rahmen solcher Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse mit dem bisherigen Kenntnisstand in Beziehung gesetzt werden.

Während Proteine die Träger spezifischer Membranfunktionen (z.B. Signalerkennung, Katalyse von chemischen Umsetzungen und Transportvorgängen) sind, besteht die Hauptfunktion der Lipide in der Ausbildung einer stabilen Permeabilitätsbarriere und damit in der Abgrenzung der Zelle zum umgebenden Medium. Die Lipidphase stellt ein zwei-dimensionales Lösungsmittel für die übrigen Membrankomponenten dar. Zudem ist die Membranoberfläche ein in der Zelle besonders ausgezeichneter Ort, an dem bestimmte Zellbestandteile sich anreichern und miteinander in Wechselwirkung treten können.
Welche Funktionen kann man den verschiedenen Lipidkomponenten der E.coli-Membranen an Hand der gewonnenen Untersuchungsergebnisse zuschreiben? Dies wird die zentrale Fragestellung der folgenden Diskussion sein.

Die Membranlipide von E.coli bestehen nahezu ausschließlich aus Glycerophosphatiden. Diese weisen eine äußerst geringe

Monomerlöslichkeit in Wasser auf und bilden oberhalb der kritischen micellaren Konzentration (CMC<10^{-9}M) Aggregate aus (136a). Dabei lagern sich die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten der lipidgebundenen Fettsäuren aneinander und grenzen sich durch die negativ geladenen oder zwitterionischen polaren Kopfgruppen gegen das umgebende Wasser ab.

Die hydrophoben und hydrophilen Molekülteile der Phosphatide sind so dimensioniert, daß sie in den entstehenden Aggregaten etwa gleiche Flächen beanspruchen. Dies ist nur bei lamellarer, nicht aber bei zylindrischer oder micellarer Organisation gewährleistet. Daher bilden diese Lipide in wässriger Suspension spontan molekulare Doppelschichten aus (3.2.2.1. / 3.3.).

Auch in den E.coli-Membranen liegt zumindest der größte Teil der Lipide in lamellarer Phase vor (3.3.). Ob nicht-lamellare Strukturen daneben bei bestimmten Membranprozessen (33,39,135) eine Rolle spielen, ist umstritten. Der mit Hilfe der DMR-Spektroskopie geführte Nachweis für die Konstanz der Phospholipidkonformation (3.3.) rechtfertigt den Ansatz, reine Lipid-Wasser-Systeme als Modelle für die proteinfreien Bereiche biologischer Membranen zu verwenden.

Die treibende Kraft für die Aggregation der Phospholipide liegt in der Repulsion der Kohlenwasserstoffketten durch das umgebende wässrige Medium. Die Stabilität einer Lipiddoppelschicht steigt daher mit der Länge der lipidgebundenen Fettsäureketten. Erst ab einer Kettenlänge von mehr als 12 Kohlenstoffatomen kann sich eine stabile Permeabilitätsbarriere ausbilden (11,53,80). Da die Anziehungskräfte zwischen den Alkylketten selbst äußerst gering sind (136a), stellen die Lipiddoppelschichten oberhalb der Umwandlungstemperatur vom Gel- in den flüssig-kristallinen Zustand äußerst flexible Strukturen mit hoher innerer Dynamik dar. Untersuchungen mit Fettsäure-auxotrophen Mutanten von E.coli haben gezeigt, daß fluide Membranbereiche für das Wachstum der Zellen essentiell sind. Bei einer Verlängerung der Fettsäureketten erhöht

sich aber mit der Stabilität der Doppelschichten auch die Lipidphasenumwandlungstemperatur.

Die Lipide der im Rahmen dieser Doktorarbeit isolierten Mutante T114GP (siehe 3.2.5.) enthalten nur gesättigte Fettsäuren mit einer - verglichen mit Wildtypzellen - ungewöhnlich niederen Kettenlänge von 14 Kohlenstoffatomen. Die Zellen dieses Stammes sind kältesensitiv und können erst bei Temperaturen oberhalb von 33°C wachsen, bei denen mindestens 50% der Lipide (Phasenumwandlungstemperatur T_t = 32°C) in der flüssig-kristallinen Phase vorliegen.
Eine Herabsetzung der Phasenumwandlungstemperatur und damit eine Ausweitung des permissiven Temperaturbereiches durch weitere Verkürzung der Kettenlänge ist nicht möglich, da dies zu einer drastischen Erhöhung der Permeabilität der Zellmembranen führen würde.
Durch Inkorporation von Fettsäuren, deren Packungseigenschaften von denen gesättigter Alkanketten abweichen, kann dagegen die Phasenumwandlungstemperatur herabgesetzt werden, ohne daß die Stabilität der Lipiddoppelschicht verloren geht. E.coli-Wildtypzellen synthetisieren aus diesem Grunde einfach cis-ungesättigte Fettsäuren und variieren das relative Verhältnis von lipidgebundenen gesättigten zu ungesättigten Acylgruppen in der Weise, daß die Lipidphasenumwandlungstemperatur erst etwa 10°C unterhalb der jeweiligen Wachstumstemperatur einsetzt.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte zum ersten Male gezeigt werden, daß man das Phasenverhalten der Lipide einer biologischen Membran auch durch Veränderung der Kopfgruppen-Zusammensetzung manipulieren kann. Es stellte sich heraus, daß die Akkumulation von PG in Mutanten mit Defekt in der Cardiolipinsynthese zu einer Herabsetzung der Lipidphasenumwandlungstemperatur führt (3.2.). Durch Einführung der cls-Mutation ließen sich die letalen Effekte eines Defektes in der Synthese ungesättigter Fettsäuren (Genotyp: fabB) partiell aus-

gleichen, was Vorbedingung für die Isolation des oben erwähnten Stammes T114GP war, der trotz der fabB-Mutation zu kontinuierlichem Wachstum ohne Fettsäuresupplement fähig ist.

Eine weitere physikalische Eigenschaft der Lipidphase, deren Veränderung zu einer Störung der Membranfunktionen führt, ist die negative Oberflächenladungsdichte.

Das Verhältnis von anionischen zu zwitterionischen und ungeladenen Lipiden liegt in den Membranen vieler Organismen bei etwa 1:3 (42). In den E.coli-Membranen ist das zwitterionische PE mit einem Anteil von ca. 80% die Hauptlipidkomponente. Daneben findet man etwa 20% anionische Lipide. Von Ohta et al. (92), Raetz (108) und Hawrot et al. (55) sind Mutanten mit temperatursensitiven Enzymen der PE-Synthese isoliert worden. Werden diese Mutanten bei der restriktiven Temperatur angezogen, so akkumulieren sie anionische Lipide und stellen nach einigen Generationen ihr Wachstum ein. Der bakterizide Effekt scheint unabhängig von der Art des akkumulierenden anionischen Lipids zu sein: pss⁻-Stämme akkumulieren Cardiolipin (106), psd⁻-Stämme PS und Cardiolipin (55) und die im Rahmen dieser Arbeit isolierten psd⁻-cls⁻-Doppelmutanten PS und PG (siehe 3.4.2.). Trotz dieser Unterschiede differieren die verschiedenen Stämme nicht signifikant im Wachstumsverhalten bei nicht-permissiver Temperatur. Eine partielle phänotypische Supprimierbarkeit der Mutationen durch divalente Kationen (56,111) spricht dafür, daß nicht der Mangel an einer essentiellen Menge von PE, sondern die Verschiebung der Oberflächenladungsdichte direkt cytotoxisch wirkt. Nach den hier gewonnenen Ergebnissen (3.4.2.) scheint eine kopfgruppeninduzierte Verschiebung der Lipidphasenumwandlungstemperatur keine Rolle zu spielen. Zur Einstellung einer bestimmten mittleren Oberflächenladungsdichte in der Membran werden zwei Lipide, ein zwitterionisches und ein anionisches benötigt. Die E.coli-Membranen enthalten neben dem zwitterionischen PE mit PG und Cardiolipin zwei anionische Lipide. Zellen mit Defekt in der Cardiolipinsynthese (Genotyp: cls), die in exponentieller Wachs-

tumsphase nur noch Spuren von Cardiolipin (<0,2%) enthalten, sind in ihren Wachstumseigenschaften gegenüber Wildtypzellen nicht beeinträchtigt (3.1.2.1.). Cardiolipin scheint also kein essentieller Bestandteil der Lipidphase der bakteriellen Membranen zu sein. Die cls-Mutation führt zu keiner Verschiebung der negativen Oberflächenladungsdichte, da der Mangel an Cardiolipin durch eine Erhöhung des PG-Gehalts ausgeglichen wird.

Vor allem auf Grund von Rekonstitutionsexperimenten ist vermutet worden, daß neben den physikalischen Eigenschaften der Membranlipidphase auch spezifische Wechselwirkungen zwischen bestimmten chemischen Strukturen der Lipidmoleküle und Proteinen von biologischer Bedeutung sind.

Integrale Membranproteine verlieren bei Entfernung der Lipide im allgemeinen ihre biologische Aktivität. Bei vielen kann man sie durch Zugabe von Lipiden rückgewinnen. Dabei ist bei einer Reihe von Proteinen eine Spezifität hinsichtlich der polaren Kopfgruppen des reaktivierenden Lipids beobachtet worden (49,117).

Es wurde u.a. vermutet, daß Cardiolipin, das bei Eucaryonten eine Hauptlipidkomponente der inneren mitochondrialen Membran ist (65), dort wie in der bakteriellen Cytoplasmamembran spezifische Funktionen bei bioenergetischen Prozessen zu erfüllen hat (65). Mehrere Moleküle Cardiolipin scheinen relativ fest mit der mitochondrialen Cytochromoxidase assoziiert zu sein (114). Zudem wiesen einige Rekonstitutionsexperimente auf eine essentielle Rolle des Cardiolipins als Aktivator von Atmungsenzymen der E. coli-Membran hin (37,47). Da die cls-Mutation sich weder auf das Wachstum der Zellen noch auf die in vitro-Aktivität von Atmungsenzymen (105) auswirkt, ist zu vermuten, daß spezifische Wechselwirkungen zwischen Membranproteinen und Cardiolipin keine essentielle Rolle spielen. Watts et al. haben zudem kürzlich gezeigt, daß die Aktivität der mitochondrialen Cytochromoxidase nach Ent-

fernung aller Lipide auch ohne Cardiolipinzusatz wieder rückgewonnen werden kann (151).

Untersuchungen von Chamberlain und Webster (24) haben auf spezifische Wechselwirkungen zwischen Cardiolipin und dem Hüllprotein des Phagen M13 hingewiesen. Die Autoren vermuteten, daß eine spezifische Assoziation von 5-10 Molekülen Cardiolipin mit einem Proteinmolekül notwendige Bedingung für dessen Einbau in die Wirtszellmembran ist. Die unter 3.1.2.3. beschriebenen Experimente zeigen jedoch, daß auch hier derartige Wechselwirkungen ohne Bedeutung sind.

Wie bei den E.coli-Mutanten der Lipidsynthese weisen auch einige Untersuchungen mit Zellen höherer Organismen darauf hin, daß die physikalischen Eigenschaften der Lipidphase der Membran von größerer Bedeutung sind, als die exakte chemische Struktur der polaren und apolaren Molekülteile der Phospholipide (61). So kann zum Beispiel bei Cholin-auxotrophen Neurospora crassa-Zellen und Mäuse-Fibroblasten die Struktur der zwitterionischen Lipide in Grenzen variiert werden, ohne daß das Zellwachstum beeinträchtigt wird (63, 119).

Systematische Rekonstitutionsversuche haben in neuerer Zeit zudem gezeigt, daß Spezifitäten hinsichtlich der Struktur des rekonstituierenden Lipids im allgemeinen vom Rekonstitutionsprozess selbst bestimmt werden und daher ohne biologische Relevanz sind (49,117). Eine Ausnahme macht in diesem Zusammenhang die mitochondriale Hydroxybutyrat-Dehydrogenase, bei der eine absolute Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von Lecithin gut dokumentiert ist (66). Um zu einem besseren Verständnis der Lipid-Protein-Wechselwirkungen zu kommen, wird z.Z. auch intensiv untersucht, welchen Einfluß die Membranproteine auf die physikalischen Eigenschaften der Lipide haben (26).

Vor allem ESR-spektroskopische Untersuchungen führten zu der

Annahme, daß die integralen Membranproteine von einer langlebigen Schicht aus immobilisierten Lipiden umgeben sind. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden E.coli-Zellen mit selektiv deuterierten Fettsäuren supplementiert und DMR-Spektren von Zellen, isolierten Membranen und Liposomen aus den extrahierten Lipiden aufgenommen. Wie bei rekonstituierten Systemen (26,94,126) war bei Zellen und isolierten Membranen jeweils nur ein Linienpaar mit einem kleineren Deuterium-Ordnungsparameter als bei Liposomen zu beobachten (3.3.). Vermutlich werden die Kohlenwasserstoffketten der Lipide durch direkten Kontakt mit den unebenen Proteinoberflächen in extreme Konformationen oder Orientierungen gezwungen. Schnelle Platzwechselvorgänge (Austauschfrequenz $>10^4$ Hz) scheinen dafür zu sorgen, daß innerhalb kurzer Zeit alle Lipide mit den Proteinoberflächen in Berührung kommen. Die DMR-Untersuchungen widerlegen die Annahme, daß integrale Membranproteine von einer langlebigen Schicht von immobilisierten Lipiden umgeben sind.

Mit der Isolation des Stammes T114GP (3.2.5) ist klar gezeigt, daß die einzige essentielle Funktion der ungesättigten Fettsäuren bei E.coli in der Herabsetzung der Phasenumwandlungstemperatur liegt. Durch integrale Membranproteine hervorgerufene Störungen der Lipidphase können folglich auch ohne die speziellen Packungseigenschaften (68) von Fettsäureketten ausgeglichen werden, deren Geometrie von der gesättigter Alkanketten abweicht. Die Heterogenität der Lipidzusammensetzung biologischer Membranen ist bisweilen mit solchen Adaptationsaufgaben in Zusammenhang gebracht worden (117).

Erstaunlich ist, daß auch nach Reduktion der mittleren Fettsäure-Kettenlänge von 16 bis 17 bei Wildtyp-Zellen auf 14 bei Stamm T114GP und der damit verbundenen Verringerung der Dicke der Lipidmatrix die essentiellen Membranfunktionen erhalten bleiben.

Neben strukturellen Aufgaben haben einige Membranlipide auch Funktionen im Rahmen des Zellstoffwechsels zu erfüllen. So werden z.B. in Zellen höherer Organismen mehrfach ungesättigte Fettsäuren in Prostaglandine und Cholesterin in Steriodhormone umgewandelt. Während PE in E.coli-Zellen metabolisch weitgehend stabil ist, weisen PG und Cardiolipin einen beträchtlichen Umsatz auf. Der größte Teil dieses Umsatzes ist auf die Obertragung von Glycerinphosphat-Resten auf Oligosaccharide des periplasmatischen Raums zurückzuführen (120). Ober die Bedeutung dieser Oligosaccharide und die Enzymologie des Polyglycerophosphatidumsatzes ist wenig bekannt (109, 121). Der Defekt in der Cardiolipinsynthese führt zu einer mehr als fünffachen Reduktion des PG-Umsatzes (3.1.2.2.). Dies läßt vermuten, daß die Glycerinphosphatreste der Oligosaccharide vom Cardiolipin herrühren. Da Cardiolipin aus PG entsteht, weisen beide anionische Lipide in Wildtypzellen einen hohen Umsatz auf. Denkbar ist, daß die Funktion von Cardiolipin hier darin besteht, Phosphatidylglycerinphosphat-Reste als hydrophobe Träger bei Synthese und Transport der Saccharide zu liefern.

Die beschriebenen Untersuchungen mit Mutanten der Lipidsynthese bestätigen den großen experimentellen Wert des besser als bei allen anderen Organismen ausgearbeiteten genetischen Instrumentariums von E.coli. Dieses Bakterium wird daher vermutlich auch in Zukunft das bevorzugte Modellsystem bei der Bearbeitung vieler biologischer Fragestellungen sein.

A b s t r a c t

PLUSCHKE, GERD

FUNKTION DER PHOSPHOLIPIDE VON Escherichia coli
Untersuchungen mit Mutanten der Lipidsynthese

Es werden die Eigenschaften einer Mutante mit Defekt in der Cardiolipinsynthese (Genotyp:cls) beschrieben. Die Mutation kartiert nahe dem trp-Operon bei min 27 auf dem E.coli-Chromosom. Im Vergleich zu isogenen Referenzstämmen mit Wildtyp-cls^+-Allel weisen Zellen,die das defekte cls^--Allel enthalten, folgende Eigenschaften auf:
Das Verhältnis von zwitterionischem (80% Phosphatidyläthanolamin(PE)) zu anionischem Lipid (20% Phosphatidylglycerin(PG) und Cardiolipin(CL)) ist nahezu unverändert, da die mehr als fünfzehnfache Reduktion des CL-Gehalts (<0,2%) durch eine Erhöhung des prozentualen Anteils von PG ausgeglichen wird.
Der Umsatz von PG ist um das Fünffache reduziert.
Die cls-Mutation wirkt sich weder auf das Wachstum der Bakterien noch auf den Einbau des Hüllproteins des Phagen M13 in die bakterielle Cytoplasmamembran aus.
Da PG erst bei etwa 25°C tieferer Temperatur als PE und CL von der flüssig-kristallinen in die geordnete Phase übergeht, führt die Erhöhung des PG-Gehaltes in den cls-Mutanten zu einer Erniedrigung der Phasenumwandlungstemperatur T_t der Membranlipide. Dieser kompensatorische Effekt ermöglichte es, von einer Mutante mit Defekt in der Synthese ungesättigter Fettsäuren ein Derivat (Genotyp:fabB,cls) zu isolieren, dessen Lipide (T_t=32°C) nur noch gesättigte Fettsäuren enthalten. Dieser Stamm ist erst bei Temperaturen oberhalb von 33°C zu kontinuierlichem Wachstum fähig.
Mit Hilfe der Deuteriummagnetischen Resonanzspektroskopie wird gezeigt, daß die Konformation der Phospholipide in den E.coli-Membranen mit der in proteinfreien Liposomen weitgehend identisch ist. Die Membranproteine rufen jedoch eine allgemeine Erniedrigung des Ordnungsparameters der lipidgebundenen Fettsäureketten hervor.
Abschließend wird eine Methode zur Fusion von Membranvesikeln vorgestellt.

6. Literaturverzeichnis

1. Akamatsu,Y. (1974) J.Biochem. 76, 553
2. Ames,G.F. (1968) J.Bacteriol. 95, 833
3. Andersen,H.C. (1978) Ann.Rev.Biochem. 47, 359
4. Anraku,Y. (1967) J.Biol.Chem. 242, 793
5. Asbeck,V.F. , Beyreuther,K. , Köhler,H.,von Wettstein,G. und Braunitzer,G. (1969) Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 350, 1047
6. Bachmann,B.J., Brooks Low,K. und Taylor,A.L. (1976) Bacteriol.Rev. 40, 116
7. Baldassare,J.J., Rhinehart,H. und Silbert,D.F. (1976) Biochemistry 15, 2986
8. Bell,R.M. (1974) J.Bacteriol. 117, 1065
9. Bell,R.M., Mavis,R.D., Osborn,M.J. und Vagelos,P.R. (1971) Biochim. Biophys.Acta 249, 628
10. Bligh,E.G. und Dyer,W.J. (1959) Can.J.Biochem. 37, 911
11. Blok,M.C., van der Neut-Kok,E.C.M., van Deenen,L.L.M. und de Gier,J. (1975) Biochim.Biophys.Acta 406, 187
12. Braun,V. (1978) 28th Sympos.Soc.Gen.Microbiol. Seite 111-138
13. Braun,V, und Hantke,K. (1974) Ann.Rev.Biochem. 43, 89
14. Broekman,J.H.F.F. und Steenbakkers,J.F. (1973) J.Bacteriol.116,285
15. Brooks Low,K. (1972) Bacteriol.Rev. 36, 587
16. Büldt,G., Gally,H.U., Seelig,A., Seelig,J. und Zaccai,G. (1978) Nature 271, 182
17. Cronan,J.E. (1968) J.Bacteriol. 95, 2054
18. Cronan,J.E. (1975) J.Biol.Chem. 250, 7074
19. Cronan,J.E. (1978) Ann.Rev.Biochem. 47, 163
20. Cronan,J.E. und Gelmann,E.P. (1973) J.Biol.Chem. 248, 1188
21. Cronan,J.E. und Gelmann,E.P. (1975) Bacteriol.Rev. 39, 232
22. Cronan,J.E. und Vagelos,P.R. (1972) Biochim.Biophys.Acta 265, 25
23. Cronan,J.E., Weisberg,L.J. und Allen,R.G. (1975) J.Biol.Chem. 250, 5835
24. Chamberlain,B.K. und Webster,R.E. (1976) J.Biol.Chem. 251, 7739
25. Chamberlain,B.K. und Webster,R.E. (1978) J.Bacteriol. 135, 883
26. Chapman,D., Gomez-Fernandez,J.C. und Goni,F.M. (1979) FEBS Lett. 98, 211
27. Chapman,D. und Quinn,P.J. (1976) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73, 3971

28. Chattopadhyay,P.K., Lai,J. und Wu,H.C. (1979) J.Bacteriol. 137, 309
29. Chattopadhyay,P.K. und Wu,H.C. (1977) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 5318
30. Comfurius,P. und Zwaal,R.F.A. (1977) Biochim.Biophys.Acta 488, 36
31. Cowley,A.C., Fuller,N.L., Rand,R.P. und Parsegian,V.A. (1978) Biochemistry 17, 3163
32. Cullis,P.R. und de Krujff,B. (1978) Biochim.Biophys.Acta 513, 31
33. Cullis,P.R. und Hope,M.J. (1978) Nature 271, 627
34. Cullis,P.R., Verkleij,A.J. und Ververgaert,P.H.J.T. (1978) Biochim. Biophys.Acta 513, 11
35. Curatolo,W., Verma,S.P., Sakura,J.D., Small,D.M., Shipley,G.G. und Wallach,D.F.H. (1978) Biochemistry 17, 1802
36. Dahlquist,F.W., Muchmore,D.C., Davis,J.H. und Bloom,M. (1977) Proc. Natl.Acad.Sci.USA 74, 5435
37. Dancey,G.F. und Shapiro,B.M. (1977) Biochim.Biophys.Acta 487, 368
38. Deamer,D.W., Leonard,R., Tardieu,A. und Branton,D. (1970) Biochim. Biophys.Acta 219, 47
39. de Kruijff,B., van den Besselaar,A.M.H.P., Cullis,P.R., van den Bosch,H. und van Deenen,L.L.M. (1978) Biochim.Biophys.Acta 514, 1
40. de Leij,L. und Witholt,B. (1977) Biochim.Biophys.Acta 471, 92
41. Devor,K.A., Teather,R.M., Brenner,M., Schwarz,H., Würz,H. und Overath,P. (1976) Eur.J.Biochem. 63, 459
42. Dewey,M.M. und Barr,L. (1970) Curr.Top.Membr.Transp. 1, 6
43. di Rienzo,J.M.,Nakamura,K. und Inouye,M. (1978) Ann.Rev.Biochem. 47, 481
44. Duckwitz-Peterlein,G., Eilenberger,G. und Overath,P. (1977) Biochim. Biophys.Acta 469, 311
45. Echols,H., Garen,A., Garen,S. und Torriani,A. (1961) J.Mol.Biol. 3, 425
46. Elworthy,P.H. (1962) J.Chem.Soc. 4897
47. Esfahani,M., Rudkin,B.B., Cutler,C.J. und Waldron,P.E. (1977) J.Biol. Chem. 252, 3194
48. Fricke,U. (1975) Analyt.Biochem. 63, 555
49. Gennis,R.B. und Jonas,A. (1977) Ann.Rev.Biophys.Bioeng. 6, 195
50. Haest,C.W.M., de Gier,J., van Es,G.A., Verkleij,A.J. und van Deenen, L.M.M. (1972) Biochim.Biophys.Acta 288, 43
51. Harder,M.E., Ladenson,R.C., Schimmel,S.D. und Silbert,D.F. (1974) J.Biol.Chem. 249, 7468

52. Hauser,H. in Water (Ed. F.Franks) Plenum Press, New York 1975
53. Hauser,H. und Barratt,M.D. (1973) Biochem.Biophys.Res.Commun. 53, 399
54. Hauser,H., Finer,E.G. und Darke,A. (1977) Biochem.Biophys.Res.Commun. 76, 267
55. Hawrot,E. und Kennedy,E.P. (1975) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 72, 1112
56. Hawrot,E. und Kennedy,E.P. (1978) J.Biol.Chem. 253, 8213
57. Henning,U., Dennert,G,, Rehn,K. und Deppe,G. (1969) J.Bacteriol. 98, 784
58. Hirschberg,C.B. und Kennedy,E.P. (1972) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 69, 648
59. Hitchcock,P.B., Mason,R., Thomas,K.M. und Shipley,G.G. (1974) Proc. Natl.Acad.Sci.USA 71, 3036
60. Hofmann,E.G. und Jagodzinski,H. (1955) Z.Metallkunde 46, 601
61. Horwitz,A.F. (1977) in Dynamic Aspects of Cell Surface Organization (Poste,G. und Nicolson,G.L. (Ed.)) Elsevier/North-Holland
62. Hostetler,K.Y., van den Bosch,H. und van Deenen,L.L.M. (1972) Biochim.Biophys.Acta 260, 507
63. Hubbard,S.C. und Brody,S. (1975) J.Biol.Chem. 250, 7173
64. Hubbel,W.L. und Mc Connell,H.M. (1971) J.Am.Chem.Soc. 93, 314
65. Ioannou,P.V. und Golding,B.T. (1978) Progr.Lipid.Res. 17, 279
66. Isaacson,Y.A., Deroo,P.W., Rosenthal,A.F., Bittman,R., McIntyre,J.O., Bock,H.G., Gazzotti,P. und Fleischer,S. (1979) J.Biol.Chem. 254, 117
67. Isono,K., Krauss,I. und Hirota,Y. (1976) Mol.Gen.Genet. 149, 297
68. Israelachvili,J.N. (1977) Biochim.Biophys.Acta 469, 221
69. Jackson,M.B. und Cronan,J.E. (1978) Biochim. Biophys.Acta 512, 472
70. Jendrasiak,G.L. und Hasty,J.H. (1974) Biochim.Biophys.Acta 337, 79
70a. Jones,N.C. und Osborn,M.J. (1977) J.Biol.Chem. 252, 7398
71. Kates,M. Techniques of Lipidology (1972) North-Holland Publ.Comp.
72. Ladbrooke,B.D. und Chapman,D. (1969) Chem.Phys.Lipids 3, 304
73. Laemmli,U.K. und Favre,M. (1973) J.Mol.Biol. 80, 575
74. Lee,A.G. (1975) Progr.Biophys.Molec.Biol. 29, 3
75. Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L. und Randall,R.J. (1951) J.Biol.Chem. 193, 265
76. Lugtenberg,E.J.J. und Peters,R. (1976) Biochim.Biophys.Acta 441, 38
77. Lusk,J.E. und Kennedy,E.P. (1972) J.Bacteriol. 109, 1034
78. Luzzati,V. (1968) in Biological Membranes (Ed. Chapman,D.) Acad.Press
79. MacDonald,R.C., Simon,S.A. und Baer,E. (1976) Biochemistry 15, 885

80. Mandersloot,J.G., Reman,F.C., van Deenen,L.L.M. und de Gier,J. (1975) Biochim.Biophys.Acta 382, 22
81. Marcelja,S. (1976) Biochim.Biophys.Acta 455, 1
82. Marr,A.G. und Ingraham,J.L. (1962) J.Bacteriol. 84, 1260
83. Marsh,D., Watts,A. und Knowles,P.F. (1976) Biochemistry 15, 3570
84. Marvin,D.A. und Hohn,B. (1969) Bacteriol.Rev. 33, 172
85. Miller,C. und Racker,E. (1976) J.Membrane Biol. 26, 319
86. Miller,J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics Cold Spring Harbor Laboratory
87. Mitsui,T. (1978) Advances in Biophysics Vol.10 S. 97-135
88. Mühlradt,P.F. und Golecki,J.R. (1975) Eur.J.Biochem. 51, 343
89. Neidhardt,F.C., Bloch,P.L. und Smith,D.F. (1974) J.Bacteriol. 119, 736
90. Newton,C., Pangborn,W., Nir,S. und Papahadjopoulos,D. (1978) Biochim.Biophys.Acta 506, 281
91. Nunn,W.D. und Cronan,J.E. (1974) J.Biol.Chem. 249, 724
92. Ohta,A., Shibuya,I., Maruo,B., Ishinaga,M. und Kito,M. (1974) Biochim.Biophys.Acta 348, 449
93. Oldfield,E., Chapman,D. und Derbyshire,W. (1972) Chem.Phys.Lipids 9, 69
94. Oldfield,E., Gilmore,R., Glaser,M., Gutowsky,H.S., Hshung,J.C., Kang,S.Y., Tsoo,E., Meadows,M. und Rice,D. (1978) Proc.Natl.Acad.Sci USA 75, 4657
95. Osborn,M.J., Gander,J.E., Parisi,E. und Carson,J. (1972) J.Biol.Chem. 247, 3062
96. Overath,P., Brenner,M., Gulik-Krzywicki,T., Shechter,E. und Letellier,L. (1975) Biochim.Biophys.Acta 389, 358
97. Overath,P., Hill,P.P. und Lamnek-Hirsch,I. (1971) Nature New Biol. 234, 264
98. Overath,P. und Thilo,L. (1978) in Biochemistry of Cell Walls and MembranesII, International Reviews of Biochemistry (Ed. Metcalfe,J.C.) Vol.19 University Park Press,Baltimore
99. Overath,P. und Träuble,H. (1973) Biochemistry 12, 2625
100. Pande,S.V. (1976) Analyt.Biochem. 74, 25
101. Papahadjopoulos,D., Jacobson,K., Nir,S. und Isac,T. (1973) Biochim. Biophys.Acta 311, 330
102. Papahadjopoulos,D. und Miller,N. (1967) Biochim.Biophys.Acta 135, 624

103. Papahadjopoulos,D., Poste,G., Schaefer,B.E. und Vail,W.J. (1974) Biochim.Biophys.Acta 352, 10
104. Papahadjopoulos,D., Vail,W.J., Jacobson,K. und Poste,G. (1975) Biochim.Biophys.Acta 394, 483
105. Pluschke,Gerd Diplomarbeit,TÜbingen 1977
106. Portis,A., Newton,C., Pangborn,W. und Papahadjopoulos,D. (1979) Biochemistry 18, 780
107. Poste,G. und Nicolson,G.L. (Ed.) Membrane Fusion (1978) Cell Surface Reviews Vol.5 North-Holland Publ. Comp.
108. Raetz,C.R.H. (1975) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 72, 2274
109. Raetz,C.R.H. (1978) Microbiol.Rev. 42, 614
110. Raetz,C.R.H. und Newman,K.F. (1979) J.Bacteriol. 137, 860
111. Raetz,C.R.H. pers. Mitteilung
112. Rampini,C., Barbu,E. und Polonovski,J. (1970) C.R.Acad.Sci. 270, 882
113. Rand,R.P. und Sengupta,S. (1972) Biochim.Biophys.Acta 255, 484
114. Robinson,N.C. und Capaldi,R.A. (1977) Biochemistry 16, 375
115. Rosenfield,J.S., D'Agnolo,G. und Vagelos,P.R. (1973) J.Biol.Chem. 248, 2452
116. Salton,M. und Owen,P. (1976) Ann.Rev.Microbiol. 30, 451
117. Sandermann,H. (1978) Biochim.Biophys.Acta 515, 209
118. Sato,T., Koreaki,I. und Takashi,Y. Eur.J.Biochem. 78, 557
119. Schroeder,F., Perlmutter,J.F., Glaser,M. und Vagelos,P.R. (1976) J.Biol.Chem. 251, 5015
120. Schulman,H. und Kennedy,E.P. (1977) J.Biol.Chem. 252, 4250
121. Schulman,H. und Kennedy,E.P. (1979) J.Bacteriol. 137, 687
122. Seelig,J. (1977) Quart.Rev.Biophys. 10, 253
123. Seelig,J. (1978) Biochim.Biophys.Acta 505, 105
124. Seelig,J. und Browning,J.L. (1978) FEBS Lett. 92, 41
125. Seelig,A. und Seelig,J. (1977) Biochemistry 16, 45
126. Seelig,A. und Seelig,J. (1978) Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 359, 1747
127. Seelig,J. und Waespe-Sarcevic,N. (1978) Biochemistry 17, 3310
128. Shipley,G.G. (1973) in Biological Membranes II (Ed. Chapman,D. und Wallach,D.F.H.) Academic Press
129. Silbert,D.F. (1970) Biochemistry 9, 3631
130. Silbert,D.F. (1975) Ann.Rev.Biochem. 44, 315
131. Silbert,D.F., Ladenson,R.C. und Honegger,J.L. (1973) Biochim.Biophys. Acta 311, 349

132. Silbert,D.F. und Vagelos,P.R. (1967) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 58, 1579
133. Singer,S.J. und Nicholson,G.L. (1972) Science 175, 720
134. Smilowitz,H., Carson,J. und Robbins,P.W. (1972) J.Supramol.Struct. 1, 8
135. Stier,A., Finch,S.A.E. und Bösterling,B. (1978) FEBS Lett. 91, 109
136. Stockton,G.W., Johnson,K.G., Butler,K., Tulloch,A.P., Boulanger,Y., Smith,I.C.P., Davis,J.H. und Bloom,M. (1977) Nature 269, 267
136a. Tanford,C. (1978) Science 200, 1012
137. Taylor,F.R., Cronan,J.E. (1976) J.Bacteriol. 125, 518
138. Thilo,L. (1977) Biochim.Biophys.Acta 469, 326
139. Thilo,L. und Overath,P. (1976) Biochemistry 15, 328
140. Träuble,H., Eibl,H. (1974) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 71, 214
141. Träuble,H., Eibl,H. (1975) in Functional Linkage in Biomolecular Systems (Ed. Schmitt,F.O., Schneider,D.M. und Crothers,D.M.) Raven Press
142. Träuble,H. und Overath,P. (1973) Biochim.Biophys.Acta 307, 491
143. Tunaitis,E. und Cronan,J.E. (1973) Arch.Biochem.Biophys. 155, 420
144. Uehara,K., Akutsu,H., Kyogoku,Y. und Akamatsu,Y. (1977) Biochim.Biophys.Acta 466, 393
145. Vail,W.J. und Stollery (1979) Biochim.Biophys.Acta 551, 74
146. Van Dijck,P.W.M., de Kruijff,B., van Deenen,L.L.M., de Gier,J. und Demel,R.A. (1976) Biochim.Biophys.Acta 455, 576
147. Van Dijck,P.W.M., de Kruijff,B., Verkleij,A.J., van Deenen,L.L.M. und de Gier,J. (1978) Biochim.Biophys.Acta 512, 84
148. Van Golde,L.M.G., Schulman,H. und Kennedy,E.P. (1973) Proc.Natl.Acad. Sci.USA 70, 1368
149. Verkleij,A.J., de Kruijff,B., Ververgaert,P.H.J.T., Tocanne,J.F. und van Deenen,L.L.M. (1974) Biochim.Biophys.Acta 339, 432
150. Vogel,H.J. und Bonner,D.M. (1956) J.Biol.Chem. 218, 97
151. Watts,A., Marsh,D. und Knowles,P.F. (1978) Biochem.Biophys.Res.Commun. 81, 403
152. White,D.C. und Frerman,F.E. (1967) J.Bacteriol. 94, 1854
153. White,D.C. und Tucker,A.N. (1969) J.Lipid Res. 10, 220
154. Woolford,J.L., Cashman,J.S. und Webster,R.E. (1974) Virology 58, 544
155. Yeagle,P.L. (1978) Accounts Chem.Res. 11, 321

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren und Dozenten:

Zoologie:	Grell,Möhres
Pflanzenphysiologie:	Metzner,Wegmann
Mikrobiologie:	Braun,Wolf,Zähner
Anatomie:	Graumann,Mörike
Physiologie:	Betz,Jacob
Mathematik:	Dähn
Physik:	Gönnenwein,Krüger
Physikalische Chemie:	Mauser,Zeil
Anorganische Chemie:	Rüdorff
Organische Chemie:	Bayer,Hagenmaier,Müller
Biochemie:	Bücher,Guglielmi,Klingenberg,Mecke, Weitzel,Weser,Zillig

LEBENSLAUF

Gerd Pluschke

geboren am	25.3.1952
in	Bad Wildungen
Eltern	Elisabeth Pluschke, geb. Puschmann und Georg Pluschke
Schulbesuch	1958 - 1967 Volks- und Realschule in Fritzlar
	1967 - 1970 König-Heinrich-Schule in Fritzlar
	16.6.1970 Abitur
Studium	Ab WS 1970/71 Studium der Physiologischen Chemie und Biochemie an der Universität Tübingen
	SS 74 und WS 74/75 einjähriger Studienaufenthalt an der Universität München
	26.6.1977 Erlangung des Grades 'Diplom-Biochemiker'
	Von August 1977 bis Mai 1979 Anfertigung der Dissertation 'Funktion der Phospholipide von Escherichia coli. Untersuchungen mit Mutanten der Lipidsynthese am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. P. Overath